



**Universidade de
Aveiro
Ano 2011**

Departamento de Biologia

Sandra Patrícia Mendes da Silva Mota **Isolamento e identificação molecular
de micobactérias não tuberculosas**



**Sandra Patrícia
Mendes da Silva Mota**

**Isolamento e identificação molecular
de micobactérias não tuberculosas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Celeste Vilhena de Oliveira e Silva Pontes, Assistente graduada de Patologia Clínica, do Laboratório de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE e co-orientação científica da Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha

Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Anabela Pereira

Investigadora em Pós-Doutoramento do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida

Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dra Maria Celeste Vilhena de Oliveira e Silva Pontes

Assistente graduada de Patologia Clínica, do Laboratório de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE

agradecimentos

Com grande estima, expresso a minha gratidão à minha orientadora Doutora Celeste Pontes, pelo apoio e conhecimentos transmitidos, bem como pela disponibilidade e orientação.

O meu profundo e sincero agradecimento à Professora Adelaide Almeida, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, pelo apoio e ajuda prestados durante a escrita desta tese.

Aos meus colegas Hilda Batista, Nazaré Barata e Manuel Coroa muito obrigada pela forma como me acolheram quando iniciei o meu percurso profissional e por tudo o que me ensinaram sobre Micobacteriologia.

A todos os meus colegas que directa ou indirectamente permitiram e facilitaram o progresso deste trabalho.

Ao meu marido Miguel agradeço a imensa paciência, carinho e disponibilidade que sempre demonstra.

À Fátima Mendes por toda a força e incentivo.

Às minhas amigas pela amizade incondicional.

Por último, e não menos importante, expresso a minha imensa gratidão aos meus pais, Rosária e Artur a quem tudo devo.

palavras-chave

Micobactérias não tuberculosas, identificação molecular, doença por MNT, antibióticos antibacilares

resumo

As micobactérias não tuberculosas (MNT) são agentes ubíquos no ambiente, tendo sido isoladas na água, (incluindo água canalizada), no solo e nos animais, apresentando patogenicidade variável. As MNT podem ser classificadas com base em características culturais, como a produção de pigmentos e a velocidade de crescimento (MNT de crescimento rápido ou lento) ou pela sua capacidade de causar doença no homem. As MNT potencialmente patogénicas podem causar uma variedade de doenças que diferem em severidade e importância. Geralmente as doenças disseminadas em pacientes portadores de SIDA estão associadas a espécies de crescimento lento enquanto as infecções pós-traumáticas são causadas por espécies de crescimento rápido.

Tem-se verificado um aumento progressivo da importância das micobactérias não tuberculosas. O isolamento cada vez mais frequente das diferentes espécies não tuberculosas, associado ao desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais, originou também um aumento do diagnóstico de infecções por estas micobactérias. Assim torna-se fundamental avaliar em que medida o isolamento de micobactérias não tuberculosas é importante para o estabelecimento do diagnóstico da doença e para a determinação do plano terapêutico.

O objectivo deste trabalho foi avaliar a importância da detecção e identificação molecular de micobactérias não tuberculosas, de forma a estabelecer o diagnóstico e estratégia terapêutica nos doentes infectados. Neste estudo foram usadas as MNT isoladas no Serviço de Microbiologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE durante o período de 2006-2010. As amostras positivas para MNT foram identificadas através de dois métodos moleculares, o sistema Inno-lipa micobactérias da Innogenetics e o sistema Accuprobe da Gen-Probe.

Foram identificadas 433 estirpes de micobactérias das quais 108 eram micobactérias não tuberculosas. Das amostras com culturas positivas para MNT apenas 5% foram positivas no exame directo positivo.

As estirpes do Complexo *Mycobacterium avium* (MAC) foram as mais frequentes, seguidas pelo *M. fortuitum* e *M. chelonae*. As MNT identificadas causaram doença em 25% dos casos. O agente prevalente nos casos de doença foi o MAC, provocando doença pulmonar em 11 casos, infecção disseminada num caso e derrame pericárdico também num caso. Em três casos foi identificado um *M. marinum*, isolado de lesões cutâneas. Nos outros dois pacientes foi identificado, respectivamente, um *M. xenopi*, responsável por derrame pleural, e um *M. malmoense* responsável por doença pulmonar. Ao longo do período de estudo observou-se um aumento no isolamento de MNT.

Nos doentes com doença pulmonar provocada por MAC, 56% foram tratados com claritromicina associada a pelo menos mais dois antibióticos, principalmente rifampicina, etambutol e isoniazida. O doente infectado com *M. malmoense* foi sujeito ao mesmo tratamento. Os doentes com lesões cutâneas causadas por *M. marinum* foram tratados com claritromicina associada a ciprofloxacina ou doxiciclina.

Pode-se concluir que o isolamento e a identificação molecular de micobactérias não tuberculosas são importantes para o estabelecimento do diagnóstico e consequente estratégia terapêutica, de forma mais rápida e adequada.

keywords

Nontuberculous mycobacteria, molecular identification methods, NTM disease, antituberculosis drugs

abstract

The nontuberculous mycobacteria (NTM) are ubiquitous agents of the environment. They can be found in natural waters, soil and animals, presenting variable pathogenicity. The NTM can be classified according to their rate of growth (slow growing or rapid growing) and colony pigment formation, or by their ability to cause disease in man. Potentially pathogenic NTM can cause a variety of diseases that differ in severity and importance. Generally disseminated diseases in patients with AIDS are associated with slow growing species and post-traumatic infections are associated with rapid growing species.

There is a progressive increase in the importance of nontuberculous mycobacteria. Increasingly frequent isolation of different species of NTM, associated with the development of new laboratory techniques, originated an improvement in the diagnosis of infections caused by NTM. So it becomes crucial to assess how nontuberculous mycobacteria isolation contributes for establishing the disease diagnosis and for determining the therapeutic plan.

The objective of this work was to assess the importance of molecular detection in nontuberculous mycobacteria identification in order to establish the diagnosis and therapeutic strategy on patients infected by NTM. In this study were used the MNT isolated in microbiology service of Coimbra University Hospitals, during the period 2006-2010. Positive samples for MNT are identified by two molecular methods, the Inno-lipa mycobacteria of Innogenetics and the system Accuprobe of Gen-Probe.

In the study period were identified 433 strains of mycobacteria of which 108 were nontuberculous mycobacteria. Only 5% of samples with positive cultures for NTM had positive direct examination.

The NTM were identified by two molecular methods, being the most frequent strains MAC, followed by *M. fortuitum* and *M. chelonae*. The NTM identified were considered to be causing disease in 25% of cases. MAC was the most frequent in cases of disease, causing pulmonary disease in 11 cases, disseminated infection in a case and pericardial effusion also in a case. In three cases it was identified a *M. marinum* strain, isolated from skin lesions. In the other two patients it was identified a *M. xenopi*, responsible for pleural effusion, and a *M. malmoense*, responsible for lung disease. In patients with pulmonary disease caused by MAC, 56% were treated with clarithromycin associated with at least two more antibiotics, especially rifampicin, ethambutol and isoniazid, and the same antibiotics were used for the patient infected with *M. malmoense*. Patients with skin lesions caused by *M. marinum* were treated with clarithromycin associated with ciprofloxacin or doxycycline.

It can be concluded that the isolation and molecular identification of nontuberculous mycobacteria are important for establishing disease diagnosis and the consequent therapeutic strategy more quickly and appropriately.

Índice

I – Introdução.....	5
1 Género <i>Mycobacterium</i>	5
1.1 Características gerais.....	5
1.2 Taxonomia.....	7
2 Complexo <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	8
2.1 Tuberculose.....	8
2.2 Epidemiologia.....	9
2.3 Transmissão e sintomatologia	11
2.4 Patogénese da tuberculose	12
2.5 Tratamento.....	13
3 Micobactérias não tuberculosas.....	14
3.1 Epidemiologia.....	16
3.2 Patogénese e diagnóstico	16
3.3 Características das espécies mais frequentes.....	17
3.3.1 Complexo <i>Mycobacterium Avium</i>	17
3.3.2 <i>Mycobacterium kansasii</i>	18
3.3.3 <i>Mycobacterium xenopi</i>	18
3.3.4 <i>Mycobacterium marinum</i>	19
3.3.5 <i>Mycobacterium malmøense</i>	19
3.3.6 <i>Mycobacterium fortuitum</i>	19
3.3.7 <i>Mycobacterium chelonae</i>	20
3.3.8 <i>Mycobacterium gordonae</i>	20
3.3.9 <i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	20
4 Antibioterapia	21
5 Diagnóstico laboratorial.....	22
5.1 Exame directo.....	24
5.2 Exame cultural	25
5.3 Métodos moleculares.....	26
6 Objectivos.....	29
II Material e métodos.....	30

1 Fluxograma de actividades.....	30
2 Processamento e cultura das amostras para pesquisa de micobactérias.....	30
3 Identificação molecular das estirpes isoladas.....	31
3.1 Teste Inno-Lipa Mycobacteria v2	32
3.2 Teste Accuprobe.....	33
4 Recolha de dados das amostras positivas para micobactérias não tuberculosas.....	34
5 Recolha de dados e caracterização dos doentes em estudo.....	35
III Resultados.....	36
1 Caracterização da amostra.....	36
2 Características culturais das micobactérias não tuberculosas isoladas	37
3 Identificação das micobactérias não tuberculosas isoladas.....	38
4 Caracterização da população.....	41
5 Doentes infectados por micobactérias não tuberculosas	42
IV Discussão.....	45
V Conclusão.....	51
VI Referências bibliográficas.....	52
VII Anexos.....	58

Índice de Figuras e Tabelas

Figuras:

Figura 1.1 Modelo da constituição da parede celular das micobactérias	6
Figura 1.2 Micobactéria corada pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen	24
Figura 1.3 Culturas positivas em meio Lowenstein-Jensen	26
Figura 2.1 Fluxograma de actividades	30
Figura 3.1 Estirpes de micobactérias identificadas entre 2006 e 2010	36
Figura 3.2 Micobactérias não tuberculosas identificadas	39
Figura 3.3 Resultados da identificação molecular pelo teste Inno-Lipa	40
Figura 3.4 Identificação de uma estirpe <i>M. xenopi</i>	40
Figura 3.5 Resultados da identificação molecular pelo teste Accuprobe	41
Figura 3.6 Distribuição percentual das patologias associadas dos doentes estudados	42

Tabelas:

Tabela 3.1 Produtos biológicos com culturas positivas	37
Tabela 3.2 Características de crescimento e identificação das estirpes isoladas	38
Tabela 3.3 Casos de doença causada por MNT	43
Tabela 3.4 Quadro clínico dos doentes apenas com doença causada por MNT	44

Lista de Abreviaturas

ATS – American Thoracic Society

BAAR – Bacilos álcool-ácido resistentes

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

DGS – Direcção Geral de Saúde

DNA – Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

HIV – Human Immunodeficiency Virus

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

MAC – *Mycobacterium avium complex*

MGIT – Mycobacterial Growth Indicator Tube

MNT – Micobactérias não tuberculosas

MTC - *Mycobacterium tuberculosis complex*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Polymerase Chain Reaction

RLU – Unidades de luz relativa

RNA – Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)

rRNA – RNA ribossómico

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida

ZN – Ziehl-Neelsen

I. INTRODUÇÃO

1. O Género *Mycobacterium*

1.1 Características gerais.

As micobactérias pertencem à família *Mycobacteriaceae*, que possui um único género, denominado *Mycobacterium* (1).

A maioria das espécies apresenta-se como bacilos rectos ou ligeiramente curvados, com 1-4 mm de comprimento por 0,3-0,6 mm de largura. Podem apresentar uma morfologia bacilar, cocobacilar ou mais raramente uma forma filamentosa, variando de espécie para espécie. São bactérias imóveis, aeróbias ou microaerofílicas, geralmente não capsuladas e não formadoras de esporos, sendo a sua principal característica, a capacidade de resistir à descoloração quando tratadas com solução ácido-alcoólica (1, 2).

As micobactérias possuem uma parede celular de composição química e estrutura complexas, particularmente rica em componentes lipídicos, que conferem uma barreira contra a acção dos agentes físicos e químicos do meio ambiente, o que é importante não só em termos biológicos, no que diz respeito à morfologia da bactéria, como também na patogenia das respectivas infecções (3), contribuindo para a sua resistência a antibióticos utilizados correntemente na prática clínica (1).

A camada de peptidoglicano constitui um polímero que confere a forma à célula. Ligadas covalentemente ao peptidoglicano estão dois tipos de moléculas, arabinogalactanos e ácidos micólicos (4, 5).

O arabinogalactano é um polissacárido complexo, composto por moléculas extremamente raras na natureza. Os ácidos micólicos, de enorme importância na classificação taxonómica das micobactérias, são ácidos gordos de elevado peso molecular (70 a 90 carbonos), com cadeias longas, α -ramificados e β -hidroxilados (1, 5). Os ácidos micólicos conferem hidrofobicidade à parede das micobactérias e são os principais responsáveis pela sua propriedade de álcool-ácido resistência, que se traduz na dificuldade de coloração com carbol fucsina de Ziehl-Neelsen (coloração a quente) mas uma vez coradas, resistem à descoloração por soluções ácido-alcoólicas (1, 5).

A camada externa é composta por glicolípidos e ceras. Os componentes lipídicos e as proteínas constituem, respectivamente, 60% e 15% do peso da parede celular (3) (Figura 1.1).

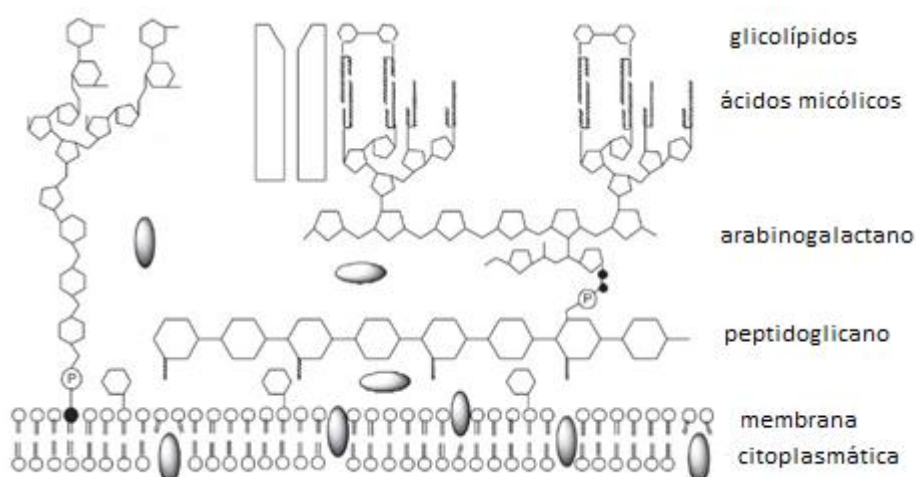


Figura 1.1 - Modelo adaptado da constituição da parede celular das micobactérias, proposto por McNeil & Brennan (<http://www.scielo.br/img/revistas/mioc/v101n7/v101n7a01f01.gif>)

A diferente velocidade de crescimento em meios de cultura específicos leva à tradicional classificação das micobactérias em dois grupos: micobactérias de crescimento rápido e micobactérias de crescimento lento. Esta classificação distingue micobactérias que crescem em menos de sete dias, sem necessidade adicional de factores de crescimento, daquelas cujo crescimento ocorre depois de sete dias, com exigências nutritivas particulares (6).

A temperatura óptima de crescimento varia consoante a espécie e pode variar entre 30°C e 45°C, e a gama de pH suportada é limitada entre 6 e 8, sendo o pH óptimo de 6,7 a 6,9 (1). O tipo de colónias que originam é variável, podendo tratar-se de colónias arredondadas de consistência mucóide, com superfície lisa ou irregular e aspecto seco ou húmido (6).

1.2 Taxonomia

Em termos taxonómicos, as micobactérias constituem um género único da família *Mycobacteriaceae*, ordem *Actinomycetales* (7). O género *Mycobacterium* contém cerca de 120 espécies e está filogeneticamente próximo dos géneros *Nocardia* e *Rhodococcus*, reflectido no conteúdo em guanina e citosina (GC) que apresentam, e no facto de serem produtores de ácidos micólicos, embora com diferentes estruturas e peso molecular (8).

Em 1959, Runyon propôs uma classificação para as micobactérias diferentes do *M. tuberculosis*, agrupando-as com base nas suas características culturais, nomeadamente o tempo de crescimento (micobactérias de crescimento rápido e de crescimento lento) e a produção ou não de pigmentos após exposição à luz e/ou na obscuridade (9, 10). A classificação de Runyon apresenta algumas limitações pois baseia-se apenas em características culturais, não envolvendo conceitos de patogenecidade nem o significado clínico das várias espécies. Assim sendo, H. David propôs uma classificação clínica das micobactérias em três grupos: 1) patogénios estritos (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. leprae*); 2) potenciais patogénicas ou oportunistas (*Mycobacterium avium* complex, *M. kansasii*, *M. fortuitum* e *M. chelonae*); 3) raramente patogénicas (espécies saprófitas como o *M. gordonae*) (2, 11).

Actualmente, a definição do género *Mycobacterium* assenta sobre três critérios: (i) estrutura de ácidos micólicos, (ii) a álcool-ácido resistência dos bacilos e (iii) um conteúdo em guanina e citosina no ADN (ácido desoxirribonucleico) na ordem dos 62-70%, com excepção para *Mycobacterium leprae* que tem cerca de 58% (8).

2. Complexo *Mycobacterium Tuberculosis*

As micobactérias reunidas no complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) são agentes patogénicos estritos, dependendo do hospedeiro para a sua sobrevivência. Este complexo integra várias espécies associadas à tuberculose humana e animal: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG (bacilo calmette-guérin), *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium microti* (12). Destas espécies, as que têm como hospedeiro principal o Homem são: *M. tuberculosis* e *M. africanum*. Acredita-se que o complexo *M. tuberculosis* provavelmente deriva de um bacilo ancestral designado "*Mycobacterium prototuberculosis*". Todos os bacilos pertencentes a este complexo são resistentes à acção de agentes químicos e sensíveis aos agentes físicos, como a radiação ultravioleta e o calor. Geneticamente, todos partilham cerca de 99,9% de semelhança nucleotídica e apresentam sequências idênticas do gene 16S rRNA (ácido ribonucleico ribossomal). No entanto, são consideradas espécies distintas, porque diferem na variedade de hospedeiros, na sua patogenicidade, no fenótipo e na epidemiologia (13), sendo as espécies identificadas e diferenciadas com base nas suas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (14).

O *M. tuberculosis* é o agente patogénico responsável pela quase totalidade dos casos de tuberculose em seres humanos. Entre os membros do complexo *M. tuberculosis*, estão também associados à tuberculose em humanos o *M. africanum* e o *M. bovis*, sendo que o primeiro surge principalmente em território africano e o segundo em locais de contacto com animais bovinos (15).

2.1. Tuberculose

A tuberculose é uma doença infecciosa causada principalmente por *M. tuberculosis*, também conhecido como bacilo de Koch, em homenagem a Robert Koch, médico alemão que a identificou. A doença afecta mais frequentemente os pulmões (tuberculose pulmonar), mas também podem ser infectados outros órgãos do corpo, nomeadamente, pele, rins, nódulos linfáticos e ossos.

Em 1546 foi referida pela primeira vez a noção de contágio da tuberculose (16). Em 1679 Franciscus Silvius descreveu a existência dos típicos nódulos da tuberculose pulmonar e observou a sua evolução para cavitações, mas só em 1722 Benjamim Marten propôs a primeira explicação credível para a transmissão, atribuindo-a a um microrganismo infeccioso. Cerca de cem anos mais tarde, Jean-Antoine Villemin demonstrou o carácter infeccioso da tuberculose ao verificar que animais experimentais desenvolviam a doença quando inoculados com expectoração ou pús de doentes com tuberculose (16). Em Março de 1882, Robert Kock conseguiu isolar o agente da tuberculose, o *Mycobacterium tuberculosis*, e concluiu que este só encontra condições óptimas para se reproduzir em organismos vivos e que a principal fonte de contágio é a expectoração dos doentes tuberculosos. Os seus critérios para provar esta associação foram adoptados e são conhecidos ainda hoje como os postulados de Koch: isolamento do microrganismo, cultura e desenvolvimento da doença, por administração do microrganismo (17).

A tuberculose continua hoje a ser uma das doenças prioritárias em Saúde Pública. Para além da normal incidência, assiste-se a um crescimento de formas clínicas que não cedem à terapêutica, evoluindo para a cronicidade e levando ao aparecimento de cada vez mais estirpes multirresistentes.

2.2. Epidemiologia

A tuberculose sendo a principal causa de morte provocada por uma doença infecciosa curável, é um problema global cuja dimensão, em números absolutos, continua a crescer. Em meados da década de 80 surgiu uma nova epidemia, o HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), que originou um aumento na incidência da tuberculose em praticamente todos os países do mundo (18). Este aumento deveu-se também à má gestão do tratamento da tuberculose, e ao abandono e interrupções sucessivas da terapêutica, levando ao aparecimento da tuberculose multirresistente, ou seja, estirpes clínicas de *M. tuberculosis* resistentes a pelo menos dois dos antibióticos mais efectivos

no tratamento da tuberculose: isoniazida e rifampicina. Outros factores têm contribuído para o aumento do número de novos casos como os movimentos migratórios, a toxicodependência e o desinvestimento na luta contra a tuberculose (14, 15).

Em 2009 a incidência da tuberculose foi de 9,4 milhões de casos em todo o mundo, ou seja, 139 novos casos por 100 mil habitantes, com uma mortalidade de 1,3 milhões de pessoas (20/100 mil). A maior parte (cerca de 85%) dos casos ocorreu na Ásia e África. Dos 9,4 milhões de casos de tuberculose em 2009, 1 a 1,2 milhões estavam co-infectados pelo HIV (11 a 13%). Estes valores correspondem a uma redução significativa, relativamente aos últimos anos. A prevalência em África continua no entanto muito elevada, constituindo 80% do total de todo o mundo. Em todos os continentes, há países com uma prevalência de HIV entre os doentes de tuberculose superior a 5%, mas a maior concentração (com prevalência superior a 50%) verifica-se em 7 países da África Subsaariana e na Moldávia (19).

Em 2009 foram notificados um total de 79665 casos de tuberculose na União Europeia (UE). O decréscimo anual nos últimos 5 anos foi de cerca 3,8%. No contexto da UE, Portugal tem um ritmo de decréscimo mais acentuado (6,4%/ano), mas permanece entre os países de incidência intermédia, segundo a avaliação definitiva e a avaliação preliminar de 2010. Convencionou-se que são países de baixa incidência os países que apresentam taxa inferior a 20 casos por cada cem mil habitantes, e de alta ou incidência intermédia os que têm mais que 20 casos por cem mil habitantes. Na UE 22 países apresentam incidência baixa e 7 países incidência intermédia entre eles, Portugal. Contrastando com a descida nítida na maior parte dos países, há um aumento significativo em 6 países: Malta, Islândia, Chipre, Suécia, Reino Unido e Finlândia, maioritariamente devido a casos estrangeiros (19).

Em Portugal, em 2010 foram diagnosticados 2559 casos de tuberculose, incluindo casos novos e recidivas, dos quais 2162 correspondem a indivíduos portugueses e 397 (16%) a estrangeiros. A incidência dos casos novos foi de 22,3 por cem mil habitantes. Isto representa uma redução de 11% relativamente à taxa de incidência definitiva em 2009, dando continuidade à evolução para uma diminuição consistente desde 2002. É uma tendência que converge para a média europeia e aproxima Portugal da fasquia dos 20

casos por 100 mil habitantes, limite que define os países de baixa incidência. Por enquanto, Portugal continua entre os países de incidência intermédia, o único na Europa ocidental (20).

Em Portugal as assimetrias na distribuição geográfica são já muito menos pronunciadas: deixaram de existir regiões de alta incidência e 13 distritos do continente e as Regiões Autónomas dos Açores e Madeira são agora áreas de baixa incidência. Numa situação de incidência intermédia encontram-se ainda sete distritos do continente: Viana do Castelo, Vila Real, Bragança, Setúbal, Faro, Lisboa e Porto.

A infecção HIV/SIDA é, de longe, o factor de risco mais importante para o desenvolvimento de tuberculose activa. Em 2009, o teste HIV foi realizado em 87% dos casos de tuberculose, confirmando-se a prevalência da infecção HIV em 15% dos casos (391 casos) o que representa um decréscimo de 45% nos últimos 10 anos. É a maior prevalência registada em toda a União Europeia em 2009, predominando nos distritos de Faro (15%), Setúbal (18%) e Lisboa (20%). A maioria dos casos (81%) está concentrada nas áreas metropolitanas de Lisboa e Porto. Até 31 de Dezembro de 2010, a tuberculose foi a principal causa de morte entre as pessoas com HIV/SIDA, tendo sido responsável por 41% dos óbitos (dados do Núcleo de Vigilância Laboratorial e Doenças Infecciosas do INSA)(20).

2.3 Transmissão e sintomatologia

A transmissão da tuberculose é feita de forma directa, por via inalatória, através de gotículas libertadas durante a tosse ou espirros de um doente com tuberculose activa.

O aumento do risco de transmissão está relacionado com vários factores. A localização no pulmão, laringe ou cavidade oral; a grande carga de bacilos na expectoração; a intensidade da tosse; a existência de cavitações pulmonares e a extensão das lesões; a falta de protecção da boca e do nariz quando se tosse ou espirra e a proximidade de um doente bacilífero, principalmente em locais mal ventilados, são factores que favorecem a transmissão e que devem ser tidos em conta (21). Os doentes

com tuberculose no tracto respiratório superior e inferior são mais contagiosos do que aqueles que possuem doença noutros locais do organismo (18).

O quadro clínico da tuberculose é quase sempre insidioso e os sintomas inespecíficos não sendo, por isso, valorizados logo de início. Os principais sintomas são emagrecimento, sudorese nocturna, astenia, cansaço fácil, perda de apetite, febre baixa de predomínio vespertino e tosse persistente. Pode, no entanto, haver indivíduos que apresentem poucos ou nenhum destes sintomas (1).

O quadro sintomatológico da tuberculose pode aparecer de 4 a 12 semanas após infecção, variando conforme o sistema imunitário do indivíduo infectado e o órgão do corpo afectado. No caso de tuberculose pulmonar, os sintomas são geralmente tosse prolongada (por mais de 3 semanas), dor torácica e por vezes hemoptise (expectoração com sangue). Na tuberculose extra-pulmonar existem sintomas muito variados, dependendo do órgão atingido (18).

2.4 Patogénese da tuberculose

A principal característica da tuberculose é apresentar elevadas taxas de infecção mas baixas taxas de incidência da doença, ou seja, existe um elevado número de indivíduos infectados, mas apenas 10 % desenvolve doença clinicamente activa. Alguns indivíduos desenvolvem tuberculose logo após infecção (tuberculose primária) enquanto noutros isso só acontece anos mais tarde (tuberculose secundária ou pós-primária), devido à reactivação endógena de micobactérias que persistem em lesões residuais num estadio latente ou devido a reinfeção exógena (22).

A doença primária inicia-se pouco depois da infecção inicial pelo bacilo e é mais frequentemente observada em crianças. A lesão é periférica e ocorre habitualmente na região média e inferior do pulmão. No processo de infecção, partículas aéreas (1 a 3 μm), contendo 1 a 10 bacilos, conseguem chegar ao espaço alveolar, imediatamente sob a pleura (21). Os bacilos infecciosos são fagocitados pelos macrófagos alveolares, e ao contrário de outras bactérias, o *M. tuberculosis* impede a fusão do fagossoma com o

lisossoma. Deste modo, não se gera um ambiente hostil de pH ácido, permitindo à bactéria sobreviver e replicar-se dentro do fagossoma. Os macrófagos infectados, através da produção de citocinas, atraem monócitos, linfócitos e neutrófilos inactivados, que auxiliam no controlo da infecção. A propagação da bactéria é geralmente contida à medida que a imunidade celular se desenvolve. Os macrófagos que contêm bacilos são mortos, formando-se o centro caseoso do granuloma (lesão típica da tuberculose), rodeado por uma zona celular composta por fibroblastos, linfócitos e monócitos. Pensa-se que o *M. tuberculosis* é incapaz de se multiplicar no interior dos granulomas, mas pode permanecer latente durante décadas. Se o indivíduo possuir uma imunidade celular eficiente, a infecção pode ser parada nesta fase e os granulomas cicatrizam resultando em pequenas lesões fibrosas e calcificadas (23). No entanto, um indivíduo com uma infecção latente, em que ocorre uma alteração do seu sistema imunitário devido a infecção por HIV, fármacos imunossupressores, má nutrição ou envelhecimento, pode sofrer uma reactivação (doença pós primária). Nesta situação, o interior do granuloma liquefaz-se e permite o crescimento do *M. tuberculosis*. Este líquido pode propagar-se pelos pulmões, causando tuberculose pulmonar activa, ou propagar-se para outros tecidos pela via sanguínea ou linfática causando tuberculose extra-pulmonar. Nesta fase o indivíduo torna-se infeccioso, necessitando de terapia antibiótica (23).

A imunidade do hospedeiro é um factor crucial na reactivação da tuberculose, o que é demonstrado pelas diferentes taxas de reactivação em indivíduos imunocompetentes (5-10% durante toda a vida) e em indivíduos co-infectados por HIV (7% por ano) (24, 25).

2.5 Tratamento

O tratamento da tuberculose quando realizado correctamente, leva à cura, na quase totalidade dos casos. É um tratamento longo com antibióticos em associação o que implica uma forte adesão do paciente, sendo, por isso, previsível a falência dos esquemas de tratamento e o aparecimento de estirpes multirresistentes aos antibióticos.

De acordo com a sua eficácia terapêutica e respectiva toxicidade, os antibióticos antibacilares têm sido classificados em dois grupos, antibióticos de primeira linha, que são mais potentes e com toxicidade aceitável e os de segunda linha, menos potentes. Os antibióticos de primeira linha são os primeiros a serem administrados a todos os novos casos de tuberculose. Os de segunda linha são reservados ao tratamento dos doentes portadores de bacilos resistentes aos antibióticos de primeira linha. Estas drogas só são utilizadas em último recurso, porque são menos eficazes, mais dispendiosas e provocam efeitos adversos com maior frequência (26).

O esquema terapêutico a usar no tratamento da tuberculose deve ser escolhido tendo em consideração as características do quadro clínico, a co-existência de outras doenças, a capacidade do doente em aderir a uma terapêutica prolongada, história de tratamento prévio com esses antibióticos ou contacto próximo com doentes com tuberculose multirresistente (26).

Um paciente que tenha recuperado de um episódio de tuberculose, pode voltar a adquirir a doença por reactivação da mesma estirpe ou por reinfeção com uma estirpe diferente (14). Os factores que influenciam a recorrência da tuberculose incluem: a prevalência numa dada região, o risco de infecção e condições favoráveis ao progresso da doença após nova infecção, sendo a mais comum a infecção com HIV. (27, 28).

3. Micobactérias não tuberculosas

As micobactérias não tuberculosas (MNT), também chamadas micobactérias atípicas, micobactérias ambientais ou micobactérias oportunistas, são agentes ubíquos do ambiente, tendo sido isoladas na água, incluindo a água canalizada, no solo e nos animais e apresentam patogenicidade variável (1).

Como já foi referido, em 1959 Runyon propôs uma classificação para as micobactérias diferentes do *M. tuberculosis*. Reconhecem-se assim quatro grupos, I, II, III

e IV. Os três primeiros grupos englobam as espécies de crescimento lento (superior a uma semana), enquanto o último grupo inclui as espécies que se desenvolvem em menos de uma semana (crescimento rápido). Os três primeiros grupos distinguem-se entre si pela produção de pigmento: as estirpes do grupo I (fotocromogêneas) apenas produzem pigmento após exposição à luz; as do grupo II (escotocromogêneas) produzem pigmento independentemente da exposição à luz e as do grupo III (não cromogêneas) nunca produzem pigmento na obscuridade, mas por vezes podem pigmentar-se ligeiramente, de amarelo ou rosa sob o efeito da luz (2, 9).

As MNT também são classificadas conforme a sua capacidade de causar doença no homem, como potencialmente patogênicas e não patogênicas (21). Com o aparecimento do tratamento eficaz para a tuberculose, em 1950, a cultura das amostras tornou-se rotina e verificou-se que alguns dos casos aparentes de tuberculose eram afinal devidos a MNT. Tem-se verificado, desde então, um aumento significativo na prevalência de infecções por micobactérias não tuberculosas, sobretudo por estirpes pertencentes ao complexo *Mycobacterium avium* (MAC), desde então. Estes agentes podem causar doença pulmonar em doentes com SIDA, em doentes com doença pulmonar subjacente e em pessoas sem doença pulmonar prévia (29).

As doenças respiratórias crónicas mais associadas ao desenvolvimento de doença por MNT incluem a doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), bronquiectasias, sequelas de tuberculose, fibrose quística, fibrose por radioterapia, carcinoma broncogénico, aspiração crónica, doença esofágica e alcoolismo (30). A aspiração gástrica recorrente e a fibrose quística são as únicas condições predisponentes conhecidas para doença pulmonar por micobactérias de crescimento rápido (31).

As MNT potencialmente patogênicas podem causar uma variedade de doenças em humanos e animais que diferem em severidade e importância. Geralmente as doenças disseminadas em pacientes portadores de SIDA estão associadas a espécies de crescimento lento (32). Por outro lado, as infecções pós-traumáticas são causadas por espécies de crescimento rápido (33, 34).

3.1 Epidemiologia

A prevalência de MNT apenas pode ser estimada uma vez que estas não são reportadas em muitas partes do mundo. No entanto, há uma evidência crescente que a taxa de infecção está a aumentar (35). Muitos factores têm contribuído para este aumento, como por exemplo, um melhor reconhecimento de doença provocada por MNT e o desenvolvimento de técnicas laboratoriais que tornaram o isolamento e identificação mais rápidos e sensíveis.

As taxas de infecção por MNT na América do Norte e na Europa são respectivamente de 1-15 casos por cem mil habitantes e 0,1-2 casos por cem mil habitantes. Nos Estados Unidos as espécies mais comuns são as pertencentes ao complexo *Mycobacterium Avium* (MAC) e *M. kansasii*. No Canadá, Reino Unido e outras áreas da Europa o principal organismo causador de doença é o MAC seguido do *M. xenopi*, enquanto no Norte da Europa o MAC é logo seguido pelo *M. malmoense* (36).

As taxas de infecção por MNT estão provavelmente subvalorizadas uma vez que as pessoas sem sintomas significantes não são submetidas a investigação intensa para detectar a infecção. Além disso, é possível que a vacinação possa conferir imunidade contra infecções causadas por MNT. A suportar esta ideia, estão estudos realizados na Suécia e na República Checa que mostram que desde o fim da vacina BCG obrigatória nas crianças, houve um aumento de linfadenite cervical provocada por MNT (37).

3.2 Patogénese e diagnóstico

As estirpes de MNT podem entrar no organismo através da membrana gastrointestinal ou respiratória e menos frequentemente por inoculação (38).

Em pacientes infectados com HIV é mais frequente a entrada pelo trato gastrointestinal. As estirpes MAC sobrevivem à acidez gástrica e tendem a ser absorvidas pelas células de revestimento do intestino delgado, especialmente pelas células do íleo terminal. Os receptores através dos quais o MAC entra nas células intestinais são ainda desconhecidos. Dentro da célula, ocorre uma mudança no fenótipo, o que lhe permite

suportar melhor a acção dos macrófagos, após sair da célula. Nos pacientes com SIDA é provável que o MAC tenha acesso aos nódulos linfáticos intestinais para se poder disseminar caso as defesas do hospedeiro o permitam (38).

AS MNT podem ser inaladas pelo trato respiratório a partir da água, poeira ou outros aerossóis e a maior parte das vezes são retidas pelos cílios nasais ou pela tosse e não causam doença. Se conseguirem atingir o espaço alveolar os bacilos infecciosos são fagocitados pelos macrófagos alveolares, mas impedem a fusão do fagossoma com o lisossoma. Deste modo, não se gera um ambiente hostil de pH ácido, permitindo-lhes sobreviver e replicar (38).

Em hospedeiros imunocompetentes os linfócitos CD4 e células NK podem interagir com as células mononucleares infectadas e matar os microrganismos. O papel dos neutrófilos é controverso e parece não ser substancial, os anticorpos também não parecem ter um papel signficante (38).

Nos casos de doença pulmonar tem sido difícil avaliar quando uma cultura positiva representa contaminação, colonização do paciente ou realmente doença. Assim, é sugerido uma avaliação em conjunto das características clínicas, radiológicas e bacteriológicas para um correcto diagnóstico de doença causada por MNT (39).

Em casos de doença extra-pulmonar é sugerido uma combinação de critérios clínicos e bacteriológicos (isolamento de microrganismos de um local estéril) para o diagnóstico (39).

3.3 Características das espécies mais frequentemente isoladas

3.3.1 Complexo *Mycobacterium avium*

O complexo *Mycobacterium avium* (MAC) é composto por microrganismos isolados do ambiente comum, presentes na água e no solo (1, 37).

O MAC compreende micobactérias de crescimento lento, capazes de causar infecções em diversas espécies de seres vivos, incluindo aves, suínos e humanos, e podem

apresentar-se como assintomáticas, clinicamente significantes e, em alguns casos, fatais. Este complexo é constituído principalmente pelas espécies *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare* (40). O MAC representa um importante grupo de micobactérias associado a várias patologias humanas, especialmente às infecções disseminadas em pacientes com SIDA. Antes da epidemia da SIDA o isolamento destes microrganismos em amostras clínicas representava apenas uma colonização transitória e assintomática, a doença era principalmente observada em doentes com função pulmonar comprometida e era clinicamente idêntica à tuberculose (40).

As estirpes pertencentes a este complexo são micobactérias que crescem lentamente em meios sólidos, apresentando crescimento relativamente mais rápido em meios líquidos. A temperatura ideal de crescimento é 37°C, mas também podem crescer a 30°C, e são micobactérias não cromogéneas (1, 37).

3.3.2 *Mycobacterium kansasii*

Esta espécie foi isolada da água mas não é frequente no ambiente natural. É patogénica para o homem e provoca infecção predominantemente pulmonar, por vezes semelhante à tuberculose clássica. Pode provocar infecção disseminada em doentes imunocomprometidos e com SIDA (41). Cresce bem em todos os meios de cultura para micobactérias. Tem uma taxa de crescimento lenta a uma temperatura ideal de 37°C. É uma micobactéria fotocromogénea que se torna alaranjada quando as colónias são expostas à luz (1, 37).

3.3.3 *Mycobacterium xenopi*

Inicialmente isolado do sapo *Xenopus laevis* já foi encontrado em secreções de pessoas saudáveis e em amostras de água. É um agente patogénico para o homem, estando envolvido em casos de infecção não pulmonar, e em casos de doença disseminada em doentes imunocomprometidos (42). Cresce bem em meios sólidos e

líquidos mas apresenta uma taxa de crescimento muito lenta e a uma temperatura ideal de 42°C a 45°C. É uma micobactéria não cromogénea (1, 37).

3.3.4 *Mycobacterium marinum*

O nome deve-se ao facto de ter sido encontrada em água, sendo o seu habitat natural a água e peixes. Provoca infecção no homem com lesões cutâneas granulomatosas autolimitadas, habitualmente provocadas por lesões contraídas durante a manipulação de peixe ou manutenção de aquários (43). Tem uma taxa de crescimento lenta a uma temperatura ideal de 25°C a 30°C. É uma micobactéria fotocromogénea, apresentando colónias pigmentadas após exposição à luz (1, 37).

3.3.5 *Mycobacterium mageritense*

Deve o seu nome à cidade de Malmo, na Suécia, onde foi observado pela primeira vez. Já foi isolado em amostras de água (Finlândia) e solo (Japão). É um agente potencialmente patogénico para o homem e na Europa foram referidos mais de 200 casos (44). Cresce mal na maioria dos meios sólidos, crescendo melhor em meio líquido e a uma temperatura ideal entre 30°C a 33°C. Devido à taxa de crescimento muito lenta, pode necessitar de incubação prolongada (1, 37).

3.3.6 *Mycobacterium fortuitum*

Tem o seu habitat natural na água e é causa frequente da contaminação de instrumentos cirúrgicos. É um agente potencialmente patogénico para o Homem e é o responsável pela maioria das infecções devidas a micobactérias de crescimento rápido. Provoca essencialmente infecções de tecidos moles, tipicamente resultantes da inoculação directa por injeção, cirurgia ou traumatismo penetrante com material contaminado (45). Cresce bem em todos os meios de cultura para micobactérias, tem

crescimento rápido a uma temperatura ideal entre 30°C a 37°C. É uma micobactéria não cromogénea e forma colónias lisas (1, 37).

3.3.7 *Mycobacterium chelonae*

Esta micobactéria é assim designada por ter sido isolada da tartaruga *Chelona corticata*. Frequentemente contamina instrumentos cirúrgicos, de hemodiálise e válvulas protésicas, podendo provocar infecção de feridas, adenite cervical e endocardite. Por vezes também é encontrado em doentes imunocomprometidos (42). Apresenta uma taxa de crescimento rápido a uma temperatura ideal de 30°C, não cresce bem a 37°C e é uma micobactéria não cromogénea (1, 37).

3.3.8 *Mycobacterium gordonae*

Inicialmente foi designado por *Mycobacterium aquae* ou micobactéria “da água canalizada” devido à sua abundância em água canalizada. Pode provocar contaminação dos meios durante o isolamento de micobactérias e não é patogénico. Tem uma taxa de crescimento lenta a uma temperatura ideal de 37°C e é uma espécie escotocromogénea com pigmentação alaranjada (1, 37).

3.3.9 *Mycobacterium scrofulaceum*

Mais conhecido por provocar infecções dos gânglios linfáticos nas crianças, foi isolado na água e em plantas e é patogénico para o homem, provocando linfadenite principalmente em crianças, sendo a doença localizada, unilateral e autolimitada (46). Cresce em meios sólidos e líquidos, lentamente e a uma temperatura ideal de 37°C, podendo crescer a temperaturas mais baixas. É uma micobactéria cromogénea, apresentando colónias amareladas (1, 37).

4. Antibioterapia

O aparecimento de doenças que afectam o sistema imunológico, nomeadamente a SIDA, aumentou a incidência de doença provocada por *M. tuberculosis* e por outras espécies de micobactérias. O comportamento das diferentes espécies face aos tratamentos com antibióticos não é uniforme, o que vem demonstrar a importância da identificação das estirpes e a avaliação das resistências *in vitro*.

Os antibióticos antibacilares, como já foi referido, são classificados, em função da sua eficácia terapêutica e da sua toxicidade, em antibióticos de primeira linha e antibióticos de segunda linha. Actualmente existem cinco antibióticos de primeira linha para o tratamento da tuberculose: estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida. Os antibióticos de segunda linha são vários, como por exemplo a D-cicloserina, etionamida, ácido para-aminosalicilato, canamicina, capreomicina e amicacina (14, 47). Existem também outros antibióticos mais recentes, para os quais a experiência clínica ainda é reduzida, alguns da família das quinolonas (ofloxacina e ciprofloxacina), algumas rifamicinas (rifabutina) e o linezolid (48). A estreptomicina foi o primeiro antibiótico a ser utilizado no tratamento da tuberculose em 1942 (48). O aparecimento da isoniazida em 1950, e de outros antibióticos nos anos seguintes, tornou possível encurtar os períodos de tratamento e aumentar a sua eficácia, quando usados em associação.

A maioria dos pacientes com tuberculose pode ser tratada com sucesso com estes antibióticos durante seis meses, sendo usada nos primeiros 2 meses uma associação de isoniazida, rifampicina e pirazinamida e nos restantes 4 meses a associação isoniazida e rifampicina (48). Perante culturas positivas aos 6 meses deverá ser avaliada a possibilidade de aquisição de resistência, o que deve ser confirmado com novo teste de sensibilidade aos antibióticos e poderá ser considerada uma terapêutica alternativa. No entanto, a principal causa para culturas positivas aos seis meses é a má adesão terapêutica com incumprimento do plano de medicação. A existência de cavitações pulmonares também pode tornar mais difícil a actuação dos fármacos (39). Os doentes com SIDA devem ser tratados mais intensamente com 4 fármacos (isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol ou estreptomicina) (48).

O isolamento de outras espécies de micobactérias, principalmente nos doentes com SIDA, criou novos problemas terapêuticos, sendo necessário recorrer a antibióticos que normalmente não eram utilizados na terapêutica convencional da tuberculose. Assim sendo, os antibióticos de primeira linha utilizados em infecções causadas por MNT, são diferentes, incluindo a claritromicina, a azitromicina, a rifabutina, a amicacina e o etambutol, enquanto os de segunda linha englobam a isoniazida, a ciprofloxacina, a doxiciclina, entre outros. Por exemplo, para o tratamento de infecções por bactérias do complexo *M. avium* é indicada a associação de claritromicina ou azitromicina com etambutol, rifabutina ou ciprofloxacina; para *M. marinum* é indicado a associação de claritromicina e doxiciclina (49, 50).

5. Diagnóstico Laboratorial

O exame bacteriológico é o principal método utilizado quer para o diagnóstico, quer para o controlo do tratamento das micobacterioses, além de permitir a identificar pacientes bacilíferos (51). O diagnóstico microbiológico contempla a detecção e o isolamento da micobactéria, a identificação da espécie e/ou do complexo isolado, e a determinação da sensibilidade do microrganismo aos medicamentos antibacilares.

A hipótese diagnóstica de micobacteriose surge da observação do doente e história clínica. O diagnóstico é auxiliado pelos meios complementares de diagnóstico que compreendem, métodos imagiológicos, como a radiografia pulmonar, a ecografia, a tomografia axial computadorizada, a ressonância magnética e métodos imunológicos, como a intradermoreacção de Mantoux.

Para o diagnóstico laboratorial da tuberculose é necessário o isolamento e identificação do *M. tuberculosis* a partir de líquidos biológicos tais como expectorações,

suco gástrico, líquido pleural, ascítico e pericárdico, líquido cefalorraquideo, pús, urina, sangue ou fezes. Para o mesmo efeito, também se recorre à análise de biópsias, fragmentos de tecidos ou peças cirúrgicas dos órgãos afectados. De todos os métodos referidos, apenas os laboratoriais identificam as micobactérias e permitem a confirmação do diagnóstico. Todas as outras abordagens apenas permitem um diagnóstico presuntivo (14, 18).

Nos doentes com suspeita clínica de micobacteriose, procede-se à colheita de amostras biológicas com o objectivo de isolar e identificar a micobactéria. O processamento laboratorial do material biológico inclui homogeneização/liquefacção, descontaminação e concentração. A descontaminação serve para eliminar outras bactérias que possam estar presentes no produto a analisar e que possam inibir o crescimento de micobactérias. A concentração, feita por centrifugação, tem como objectivo aumentar a sensibilidade da microscopia e do exame cultural (2).

Um dos métodos de descontaminação mais utilizado envolve o uso de N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio, e é recomendada por ser a menos tóxica para as micobactérias. Consiste num procedimento de digestão e descontaminação da amostra através da combinação entre dois reagentes, a N-acetil-L-cisteína e o hidróxido de sódio. Amostras estéreis não necessitam de homogeneização, nem de descontaminação, sendo recomendada apenas a sua concentração através de centrifugação (14, 18, 52).

Após o processamento das amostras, realiza-se o exame directo, o exame cultural, e no caso de a cultura ser positiva, procede-se à identificação da micobactéria e realização dos testes de sensibilidade aos antibióticos. Adicionalmente existem diversos testes de biologia molecular que permitem a detecção e identificação directamente da amostra e/ou da cultura (14, 18).

5.1 Exame directo

O exame directo consiste na pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes, através da sua visualização ao microscópio, após coloração. O método de coloração convencional é a coloração de Ziehl-Neelsen (ZN). Existem ainda a coloração fluorescente com auramina, a coloração de Tan-Thiam-Hok e a coloração pela técnica de Kinyoun (uma coloração ZN modificada, em que o esfregaço é corado pela fucsina de Kinyoun, com uma concentração mais elevada, e em que não se procede ao aquecimento) (18).

A coloração de ZN permite identificar bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), que possuem uma parede celular com capacidade de fixar determinados corantes, como por exemplo a fucsina, mas que resistem à descoloração após exposição a um álcool-ácido. Deste modo, os bacilos aparecem corados de vermelho contra um fundo azul. Esta particularidade deve-se ao elevado conteúdo em lípidos na parede celular das micobactérias, conferindo assim uma característica álcool-ácido resistente (14, 18).

Quando coradas pela técnica de ZN, as micobactérias apresentam-se como bacilos finos, rectos ou curvados, corados de vermelho, por vezes com coloração irregular, isolados ou em grupos sob a forma de aglomerados, cordas ou outros pleomorfismos. Por exemplo, o fenómeno corda é visualizado após coloração de ZN a partir de uma cultura positiva em meio líquido sendo característica (não exclusiva) do *M. tuberculosis* (53) (Figura 1.2).

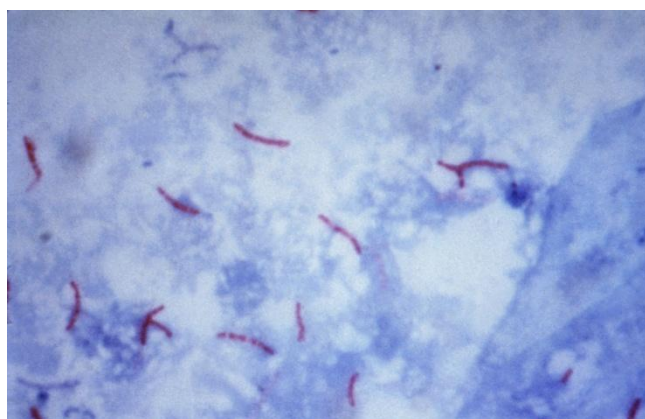


Figura 1.2 - Micobactéria corada pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen.

(http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/20040615/d094324845a24eb3a7bfe0d1f8e4a637/5789_lores.jpg)

O exame microscópico é simples, barato e rápido mas com especificidade e sensibilidade variáveis, de acordo com o tipo de amostra e a extensão da doença (14, 18).

5.2 Exame cultural

A par do exame directo, procede-se ao exame cultural, normalmente realizado em meios de cultura líquidos e sólidos. As micobactérias não se desenvolvem habitualmente, nos meios de cultura utilizados para a maioria das outras bactérias, pois têm exigências nutritivas particulares, sendo utilizados meios de cultura próprios.

O meio sólido mais frequentemente utilizado na rotina laboratorial é o meio de Lowenstein-Jensen, meio à base de ovo e contendo verde de malaquite como agente inibidor (2, 14, 18). Depois de semeados, os meios são incubados a 36-37°C durante 6 a 8 semanas, sendo examinados semanalmente para verificar e acompanhar o crescimento das micobactérias. Quando se obtêm colónias à superfície do meio, deve realizar-se um esfregaço para confirmação da presença de BAAR, pela coloração de Ziehl-Neelsen. O principal problema do exame cultural em meios sólidos é a morosidade na obtenção do resultado, que depende da lentidão de crescimento das micobactérias (2 a 6 semanas) (14, 18).

Actualmente são utilizados meios de cultura líquidos que favorecem o crescimento das micobactérias e permitem a sua detecção, através da utilização de indicadores de crescimento. Existem, também, métodos de cultura baseados na detecção fluorimétrica de consumo de oxigénio, como o BACTEC/MGIT™ 960 (Mycobacteria Growth Indicator Tube). O meio líquido do MGIT é composto por middlebrook 7H9, suplementado com ácido oleico, albumina, dextrose e catalase para favorecer o crescimento das micobactérias. Para inibir o desenvolvimento de flora contaminante é adicionado uma mistura de antibióticos (Polimixina, Anfotericina, Ácido nalidixico, Trimetropim e Azlocilina). Os tubos possuem uma base de silicone inerte impregnada com ruténio (fluorocromo). O fluorocromo está ligado a moléculas de O₂, apresentando uma fluorescência mínima (considerada igual a 0). Quando há crescimento de micobactérias

há consumo de O₂, o que leva à libertação do fluorocromo e á detecção de fluorescência que é detectada pela incidência de luz ultravioleta (18, 52). O sistema MGIT é ao mesmo tempo um sistema de leitura e de incubação (a 37° C). Este sistema efectua leituras de 60 em 60 minutos, assinalando as culturas positivas, negativas e algum erro que possa ocorrer.

Apesar das vantagens do uso de meios líquidos, recomenda-se a utilização simultânea do meio sólido pois este permite a avaliação do tipo de pigmentação das colónias, a classificação da estirpe em relação à velocidade de crescimento e a classificação morfológica das colónias (Figura 3).

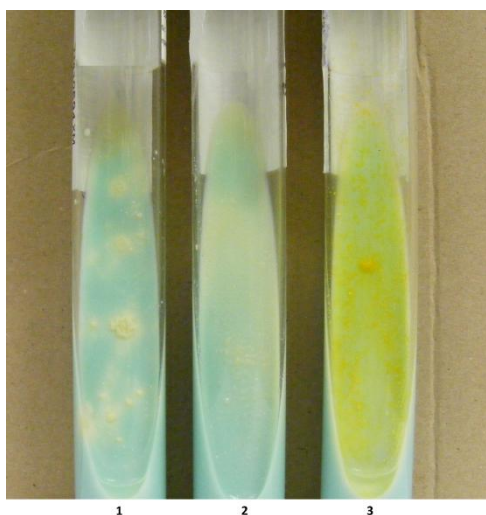


Figura 1.3 – Culturas positivas em meio Lowenstein-Jensen obtidas no laboratório de Microbiologia dos HUC,EPE.

(1) *M. tuberculosis*, (2) *M. avium*, (4) *M. gordonae*

5.3 Métodos Moleculares

As provas bioquímicas utilizadas na identificação das micobactérias, além de demoradas são muitas vezes difíceis de interpretar, daí que actualmente se utilizem técnicas de biologia molecular. Também, perante a emergência de estirpes de micobactérias multirresistentes e o aumento da tuberculose, a OMS tem alertado para a importância de um diagnóstico rápido e preciso, bem como um tratamento efectivo. Os

avanços nas técnicas de biologia molecular têm contribuído para o surgimento de novos testes de diagnóstico rápidos e sensíveis, bem como novos métodos de identificação de resistências aos antibióticos. São exemplo os métodos de hibridização com sondas de DNA e RNA e a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (18, 54).

As sondas de DNA têm sido muito bem sucedidas nos últimos anos, graças à sua disponibilidade em kits comerciais. O sistema Accuprobe (Gen-Probe, San Diego, Califórnia), o primeiro a aparecer, é altamente específico e sensível, no entanto, abrange apenas um número limitado de espécies. O sistema Accuprobe é um teste de identificação rápida de micobactérias isoladas a partir de uma cultura. Utiliza sondas de DNA e baseia-se na técnica de hibridização de ácidos nucleicos. A identificação é realizada através de sondas de DNA específicas, conjugadas com um marcador quimioluminescente, que vão hibridizar com o RNA ribossômico (rRNA) extraído a partir da cultura de micobactérias, formando um complexo DNA-RNA estável. O reagente de selecção permite diferenciar as sondas hibridizadas das não hibridizadas. A quantidade de quimioluminescência assim produzida é proporcional à quantidade de sonda hibridizada. Este sistema de sondas possui um nível alto de exactidão e especificidade, não apresentando, contudo, sensibilidade suficiente para poder ser utilizado directamente a partir da amostra clínica. O sistema Accuprobe apenas permite a identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, do complexo *Mycobacterium avium*, do *Mycobacterium gordonae* e do *Mycobacterium kansasii* (52, 55).

O desenvolvimento de um teste com diferentes sondas (caracterizadas por terem especificidades diferentes), imobilizadas em linhas paralelas sobre uma tira de papel, foi uma inovação importante, e o INNO-LiPA Micobactérias (Innogenetics, Ghent, Bélgica) foi o primeiro teste comercial de sondas de DNA capaz de identificar muitas das espécies mais frequentemente isoladas. Este sistema baseia-se no princípio da hibridização reversa. Após a amplificação da região 16S-23S do RNA ribossomal, os produtos da amplificação são hibridizados com sondas de oligonucleótidos específicos usando uma tira de tipagem na qual estão fixadas 22 linhas paralelas de sondas de DNA e 2 linhas de controlos. Após a hibridização é adicionada estreptavidina marcada com fosfatase

alcalina, que se liga a qualquer híbrido biotinilado formado anteriormente. A incubação com o cromogénio resulta num precipitado de cor púrpura/castanha (52, 55).

Os métodos moleculares desenvolvidos mais recentemente para a pesquisa estirpes com resistência a antibióticos, apresentam a potencialidade de serem aplicados directamente na amostra biológica do doente, sem se recorrer a cultura, e combinam três fases: preparação das amostras para extracção do DNA das micobactérias; amplificação de um fragmento relevante do gene por PCR e detecção de mutações por comparação da região equivalente na estirpe selvagem (56).

Os mecanismos genómicos associados à multirresistência do *M. tuberculosis* geralmente envolvem mutações nos genes que codificam determinadas proteínas que são inibidas pelas drogas ou que as metabolizam. As mutações podem produzir trocas de aminoácidos, que geram uma proteína com menos actividade ou afinidade pela droga, ou modificar a acção dos promotores dos genes, alterando a expressão genética. Cada droga apresenta, pelo menos, uma proteína envolvida no seu metabolismo, que pode ser modificada por mutações genéticas (57). Através de métodos moleculares, estas mutações podem ser detectadas com rapidez, alta sensibilidade e especificidade.

6. Objectivos

As micobactérias não tuberculosas encontram-se dispersas na natureza e apresentam patogenicidade variável. A sua capacidade em provocar doença está claramente documentada na literatura e a sua importância aumentou progressivamente, com isolamentos cada vez mais frequentes das várias espécies, levando também a um aumento do diagnóstico de infecções causadas por MNT. Um dos factores que pode ter contribuído para este aumento foi o desenvolvimento de técnicas laboratoriais que tornaram o isolamento e identificação dessas estirpes mais rápidos e sensíveis, facilitando e agilizando o diagnóstico e a definição do plano terapêutico.

O objectivo deste estudo foi avaliar em que medida o isolamento de micobactérias não tuberculosas é importante para estabelecer o diagnóstico da doença e para determinar a estratégia terapêutica.

Especificamente pretende-se:

- Determinar e caracterizar as estirpes de micobactérias não tuberculosas isoladas e identificadas no Serviço de Microbiologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE no período de 2006 a 2010.
- Correlacionar o isolamento de micobactérias não tuberculosas com as patologias associadas dos pacientes.
- Correlacionar o isolamento de micobactérias não tuberculosas com o diagnóstico de doença provocada por MNT e subsequente administração de terapêutica.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Fluxograma de actividades

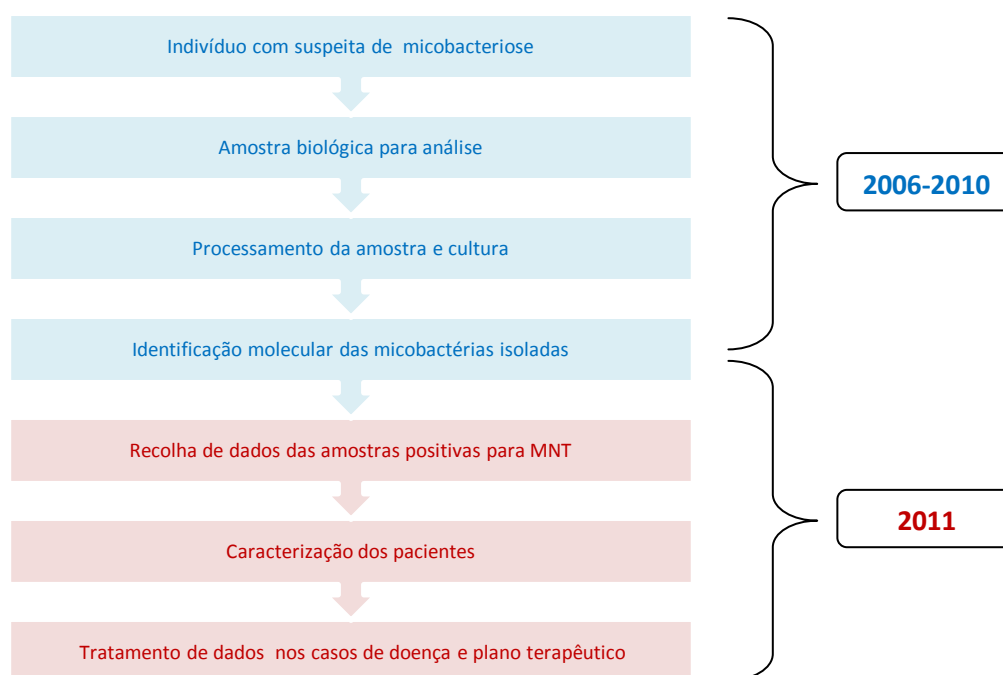


Figura 2.1 – Fluxograma de actividades

2. Processamento e cultura das amostras para pesquisa de micobactérias

As amostras a analisar foram colhidas para recipientes estéreis e estanques, e enviados rapidamente ao laboratório (26)

As amostras clínicas que contêm microrganismos constituintes da flora local ou adquirida durante a colheita necessitam de ser processadas de forma a inibir o crescimento destes contaminantes. O líquido cefalorraquídeo, entre outros, geralmente não contém flora associada, não sendo necessário o processo de descontaminação. A elevada quantidade de lípidos presente na parede celular das micobactérias torna-as mais resistentes a ácidos fortes e soluções alcalinas do que outras bactérias que possam estar presentes na amostra clínica.

Assim, sempre que necessário, os produtos biológicos foram tratados com agentes descontaminantes (Kit de descontaminação/ fluidificação MycoPrep™), durante um período de tempo controlado, que não só destroem a flora indesejada, como, fluidificam as mucosidades onde os bacilos possam estar alojados (58). Após a homogeneização, descontaminação e concentração da amostra procedeu-se à realização de um esfregaço para coloração pela técnica de Tan-Thiam-Hok (utiliza apenas duas soluções: Solução Kinyoun- contém fucsina e Solução Gabett- contém ácido sulfúrico, etanol e azul de metileno e é realizada a frio) e posterior observação microscópica.

Ressuspendeu-se o sedimento em tampão fosfato (tem como objectivo um último acerto de pH e obtenção de um volume mínimo para as culturas e salvaguarda da amostra processada) e procedeu-se à sementeira nos meios de cultura Lowenstein-Jensen e MGIT. No meio Lowenstein- Jensen colocou-se 3-4 gotas de sedimento ressuspendido, espalhando bem pelo “slant” e colocou-se na estufa de atmosfera normal a 37°C. No meio MGIT distribuiu-se 0,8 ml de PANTA (polimixina B, anfotericina, ácido nalidixico, trimetropin e azlocilina) e adicionou-se 0,5 ml de sedimento ressuspendido e introduziu-se no sistema MGIT 960. O sedimento restante foi congelado para posterior utilização se necessário. O procedimento detalhado está descrito no Anexo A.

3. Identificação molecular das estirpes MNT isoladas

Para as amostras com culturas positivas, verificou-se se o doente correspondente tinha culturas positivas nas quais já tivesse sido efectuada identificação da estirpe. No caso de doentes já estudados foi feito um esfregaço para coloração a fim de confirmar a presença de BAAR (avaliar se há uma boa evolução do tratamento).

No caso de doentes não estudados, além do esfregaço, fez-se também uma repicagem para gelose columbia (meio de cultura enriquecido) a fim de se verificar se havia alguma contaminação. Posteriormente, após se verificar que não havia contaminação, procedeu-se à identificação.

As identificações foram realizadas com o teste INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics, Ghent, Bélgica) ou com o teste Accuprobe (Gen-Probe, San Diego, Califórnia).

3.1 Teste INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2

Este teste permite a identificação a partir de estirpes isoladas em meio sólido e em meio líquido. Os testes foram efectuados de acordo com as indicações do fabricante.

O teste processou-se em cinco etapas distintas. A primeira etapa foi a extracção do DNA do organismo alvo. A extracção é ligeiramente diferente se for feita de uma cultura positiva em meio sólido ou em meio líquido. De uma cultura em meio sólido, suspendeu-se algumas colónias de micobactérias em tampão TE pH 8.0 e colocou-se a amostra no bloco de aquecimento. Centrifugou-se a amostra e posteriormente usou-se 2 µl do sobrenadante para amplificação. De uma cultura em meio líquido, pipetou-se 0,2 ml para um tubo de microcentrífuga, centrifugou-se e descartou-se o sobrenadante. Centrifugou-se novamente, descartou-se o restante sobrenadante, suspendeu-se o sedimento em tampão TE pH 8.0 e colocou-se no bloco de aquecimento. Após a incubação centrifugou-se a amostra e congelou-se a -20°C durante 30 minutos. Descongelou-se a amostra, agitou-se no vórtex, centrifugou-se e posteriormente usou-se 10 µl do sobrenadante para amplificação.

Seguiu-se a amplificação da região 16S-23S do RNA ribossomal através da técnica de PCR. Preparou-se a mistura de amplificação (27,7 µl de água destilada estéril, 10 µl de tampão de amplificação, 10 µl de solução MYC primer e 0,3 µl de Taq polymerase, para cada amostra), num tubo estéril colocado em gelo. Agitou-se a mistura no vórtex e transferiu-se para os tubos de PCR, colocados em gelo. Pipetou-se a amostra obtida na extracção (sobrenadante) no tubo da amostra, e tampão TE pH 8.0 no tubo de controlo negativo. Introduziu-se os tubos no termociclador e iniciou-se a PCR.

Marcaram-se duas tiras (ref^a 57218), uma como controlo negativo e uma com o número da amostra, e usando pinças colocaram-se no tabuleiro de incubação. Pipetou-se a solução de desnaturação, adicionou-se 10 µl do controlo negativo ou do produto da amplificação, e deixou-se incubar á temperatura ambiente.

As etapas de hibridização, lavagem adstringente e desenvolvimento de cor foram executadas na sua totalidade no sistema automático Auto-lipa. Este é um sistema completamente independente que proporciona aquecimento, arrefecimento, aspiração e pipetagem automatizados. Após a desnaturação colocou-se o tabuleiro de incubação no equipamento Auto-lipa e o restante processo foi efectuado automaticamente. Foi adicionada solução de hibridização às tiras de teste e incubadas numa plataforma de agitação a 62°C. Após o tempo de incubação, as tiras foram lavadas duas vezes com solução de lavagem adstringente, seguida de uma nova incubação a 62°C. O restante procedimento foi realizado à temperatura ambiente. As tiras foram lavadas duas vezes com solução de enxaguamento, foi adicionado o conjugado e incubado durante 30 minutos. Após a incubação, as tiras foram lavadas duas vezes com solução de enxaguamento e uma vez com tampão substrato, antes da incubação com o substrato, durante 30 minutos com agitação. Por fim, as tiras foram lavadas duas vezes com água destilada, sob agitação, durante 3 minutos.

No fim do procedimento, usando pinças retiraram-se as tiras do tabuleiro de incubação. As tiras foram então colocadas em papel absorvente e após estarem completamente secas interpretou-se os resultados. A presença de uma linha nitidamente visível traduz uma reacção positiva. O procedimento detalhado está descrito no Anexo B.

3.2 Teste Accuprobe

Este teste permite identificar estirpes isoladas em meio sólido e em meio líquido. Os testes foram efectuados de acordo com as indicações do fabricante.

O teste processou-se em quatro etapas distintas. Na primeira etapa efectuou-se a lise da amostra para libertar o DNA do organismo alvo. Pipetou-se o reagente de lise e tampão de hibridização para os tubos de lise, e transferiu-se 1 colónia de meio sólido para o mesmo tubo, fechou-se e agitou-se no vórtex. (Para culturas em meio líquido, pipetou-se o tampão de hibridização para os tubos de lise, e transferiu-se 100 µl da cultura). Colocou-se o tubo de lise no sonicador e depois incubou a 95°C durante 10 minutos.

Na segunda etapa ocorreu a hibridização do RNA libertado com as sondas de DNA marcadas com o conjugado quimioluminescente. Pipetou-se 100 µl da amostra lisada e colocou-se no tubo reagente sonda, tapou-se o tubo e incubou a 60°C durante 15 minutos.

Na terceira etapa adicionou-se o reagente de selecção, agitou-se no vórtex e incubou a 60°C durante 5 minutos. Retirou-se os tubos do bloco de aquecimento e deixou-se à temperatura ambiente durante pelo menos 5 minutos.

Por fim procedeu-se à detecção. No luminómetro, colocou-se o reagente de detecção I e II nas respectivas posições e seleccionou-se o protocolo apropriado. Retiraram-se os resíduos da superfície dos tubos com papel absorvente humedecido e procedeu-se à leitura. O resultado foi considerado positivo quando o luminómetro indicou um valor de unidades de luz relativa (RLU) superior ou igual ao valor limiar e negativo quando indicou um valor inferior. O procedimento detalhado está descrito no Anexo C.

4. Recolha de dados das amostras positivas para micobactérias não tuberculosas

As amostras com isolamentos positivos para MNT, correspondentes ao período de 2006 a 2010, foram identificadas a partir dos registos do Sector de Microbiologia (Laboratório de Patologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE) e recolheu-se os dados relativos aos isolamentos (amostra biológica, número de amostras, agente patogénico e método de identificação).

5. Recolha de dados e caracterização dos doentes em estudo

A caracterização dos doentes (idade e sexo) fez-se com base nos registos do Serviço de Microbiologia. Durante a recolha e todo o tratamento dos dados (idade e sexo) foi mantida a confidencialidade dos mesmos.

Os dados relativos à percentagem das patologias, diagnóstico e administração terapêutica dos pacientes foram facultados pelo médico do sector de Micobacteriologia, de forma anonimizada.

III RESULTADOS

1. Caracterização da amostra

Para a elaboração deste estudo foi feita uma pesquisa inicial nos registos do Serviço de Microbiologia, para seleccionar as amostras clínicas em que foram identificadas micobactérias não tuberculosas, no período de 2006 a 2010.

Nesse período foram isoladas e identificadas um total de 433 estirpes de micobactérias, das quais 325 (75%) pertenciam ao complexo *M. tuberculosis* e 108 (25%) eram micobactérias não tuberculosas. O isolamento de MNT aumentou ao longo dos anos, observando-se uma percentagem mais elevada em 2010. Ao longo do período de estudo verificou-se um aumento de micobactérias não tuberculosas em relação ao número total de micobactérias identificadas (Figura 3.1).

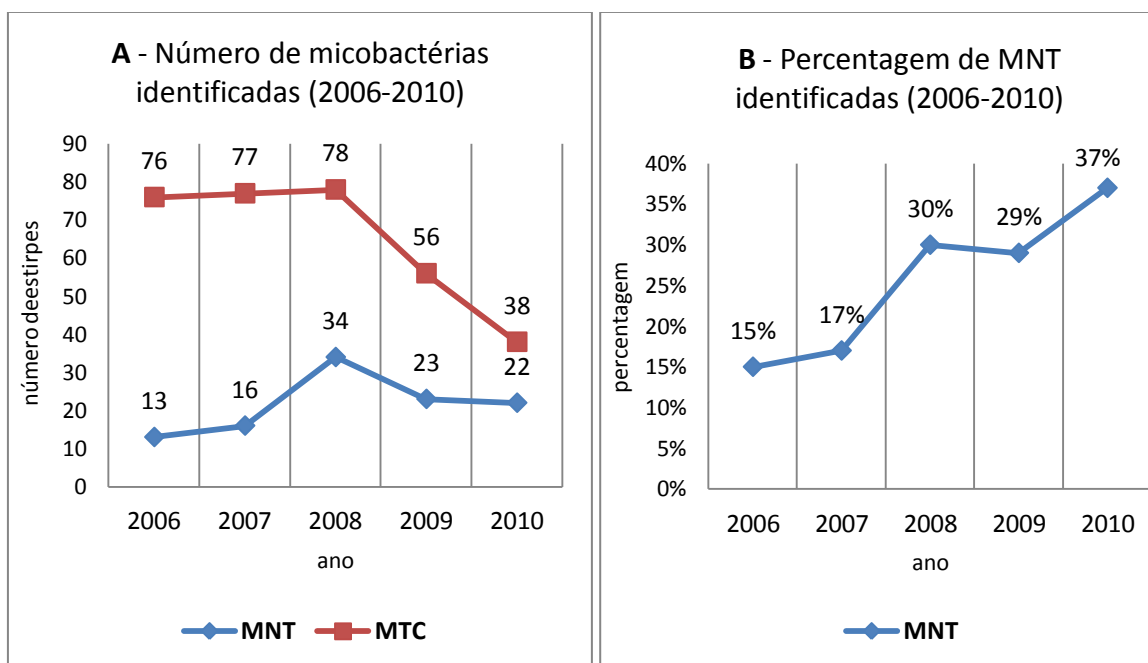


Figura 3.1: Estirpes de micobactérias identificadas entre 2006 e 2010. **A** - Variação do número de micobactérias identificadas. **B** – Variação da percentagem de micobactérias não tuberculosas identificadas. **MNT** - micobactérias não tuberculosas, **MTC**- micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Os produtos biológicos de onde foram isoladas as MNT estão apresentados na Tabela 3.1. De salientar que das 108 MNT identificadas, 58,3% (n=63) foram isoladas de amostras de expectoração; 26,8% (n=29) de amostras de aspirado brônquico e 5,6% (n=6) de amostras de biópsia.

Tabela 3.1 - Produtos biológicos com culturas positivas

Produto biológico							
EXP	AB	U	PA	Sangue	SG	Líquido	Biópsia
n=63	n=29	n=1	n=1	n=1	n=3	Pericárdico n=1 Pleural n=2	Pulmonar n=2 Ganglionar n=1 Cutânea n=3

EXP (Expectoração); AB (Aspirado Brônquico); U (Urina); PA (Pús de Abcesso); SG (Suco Gástrico);

2. Características culturais das micobactérias não tuberculosas isoladas

As micobactérias não tuberculosas apresentam diferentes taxas de crescimento consoante o grupo a que pertencem, diferenciando-se em micobactérias de crescimento rápido e micobactérias de crescimento lento, verificando-se em algumas estirpes melhor desenvolvimento num dos meios utilizados. O resultado do exame directo após homogeneização, o tempo de crescimento das culturas nos dois meios utilizados e o método de identificação utilizado, estão apresentados na Tabela 3.2. De salientar, que apenas 5% (n=6) de todas as amostras positivas apresentaram exame directo positivo após homogeneização.

Tabela 3.2 - Características de crescimento das estirpes isoladas

Estirpes identificadas	Exame directo positivo após homogeneização	Tempo médio de crescimento		Crescimento simultâneo nos dois meios utilizados	Sistema de identificação
		Meio sólido lowenstein-jensen	Meio líquido MGIT		
MAC n=47	n=3	5 semanas n=15	13 dias n=41	n=10	Inno lipa n=30 Accuprobe n=17
<i>M. fortuitum</i> n=17	n=1	2 semanas n=15	7 dias n=5	n=3	Inno-lipa n=17
<i>M. spp</i> n=13	n=0	3 semanas n=8	21 dias n=7	n=2	Inno-lipa n=13
<i>M. chelonae</i> n=13	n=1	2 semanas n=12	6 dias n=6	n=5	Inno-lipa n=13
<i>M. gordonae</i> n=10	n=0	3 semanas n=7	32 dias n=5	n=2	Inno-lipa n=8 Accuprobe n=2
<i>M. marinum</i> n=3	n=1	3 semanas n=3	30 dias n=2	n=2	Inno-lipa n=3
<i>M. xenopi</i> n=2	n=0	Sem crescimento	29 dias n=2	n=0	Inno-lipa n=2
<i>M. malmoense</i> n=1	n=0	Sem crescimento	23 dias n=1	n=0	Inno-lipa n=1
<i>M. kansasii</i> n=1	n=0	4 semanas n=1	14 dias n=1	n=1	Inno-lipa n=1
<i>M. scrofulaceum</i> n=1	n=0	Sem crescimento	14 dias n=1	n=0	Inno-lipa n=1

3. Identificação das micobactérias não tuberculosas isoladas

A escolha do sistema de identificação é influenciada pelas características de crescimento das micobactérias nos meios utilizados e pelas características dos bacilos obtidas na observação microscópica do esfregaço realizado de colónias presentes nas culturas. Para a utilização do teste Accuprobe seleccionou-se a sonda que iria hibridizar

com o rRNA da micobactéria a identificar com base nas características das colónias em meio sólido, o que permitiu uma identificação presuntiva da estirpe em questão, através do tipo de pigmentação, morfologia das colónias e velocidade de crescimento. O método também foi utilizado para estirpes que cresceram apenas em meio líquido.

Das 108 identificações efectuadas, utilizou-se o teste Accuprobe para 19 estirpes, sendo as restantes identificadas pelo teste Inno-Lipa (Tabela 3.2). Das identificações efectuadas, as estirpes mais prevalentes foram MAC com 43% (n=47), seguindo-se o *M. fortuitum* com 16% (n=17). Treze das estirpes apenas foram identificadas até ao género (Figura 3.2).

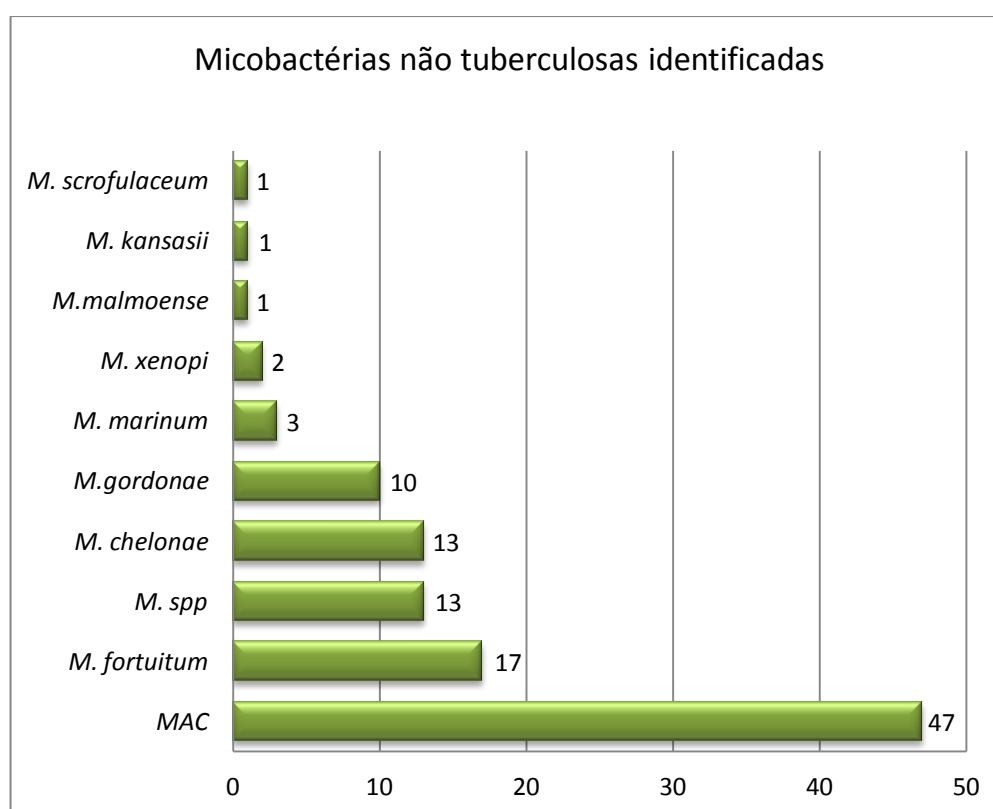


Figura 3.2 – Micobactérias não tuberculosas identificadas

O teste Inno-Lipa permite identificar 16 espécies diferentes de micobactérias, usando apenas uma tira de teste (Figura 3.3 e Figura 3.4). O teste Accuprobe apenas permite a identificação de estirpes do complexo *M. tuberculosis*, do complexo *M. avium*, estirpes *M.*

gordonae e estirpes *M. kansasii*, e o resultado é dado como positivo ou negativo para a sonda testada (Figura 3.5).

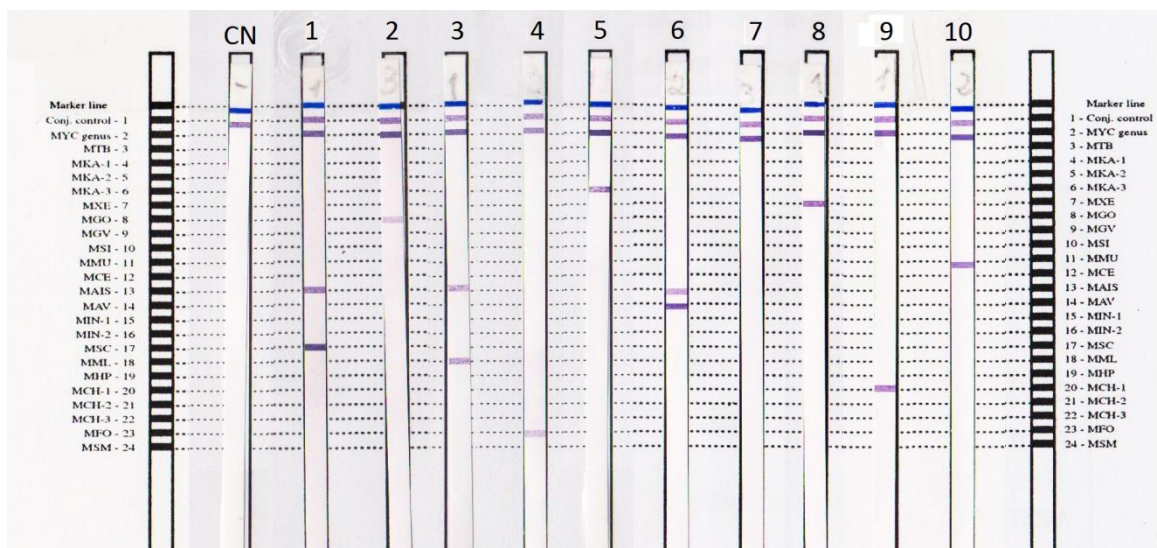


Figura 3.3 – Resultados da identificação molecular pelo teste Inno-Lipa. (CN) Controlo Negativo, (1) *M. scrofulaceum*, (2) *M. gordonae*, (3) *M. malmoense*, (4) *M. fortuitum*, (5) *M. kansasii*, (6) *M. avium*, (7) *M. spp*, (8) *M. xenopi*, (9) *M. chelonae*, (10) *M. marinum*

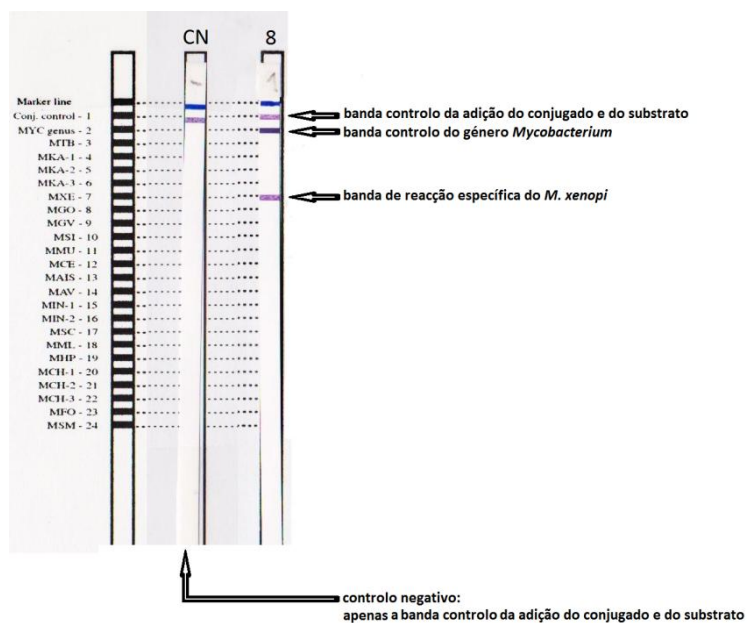


Figura 3.4 – Identificação de uma estirpe *M. xenopi*

PROTOCOL 4 AP MYCOBAC				
REPORTING THRESHOLDS:				
SAMPLE:				
BELOW	30000	=NEGATIVE		
ABOVE/EQUAL		30000=POSITIVE		
SAMPLE	REPL.	RLU	FLAG	
1	1	141	NEG	controlo negativo
2	1	175953	POS	sonda <i>M. gordonae</i>
3	1	405323	POS	sonda <i>M. avium</i>
4	1	119968	POS	sonda MTC

Figura 3.5 – Resultados da identificação molecular pelo teste Accuprobe. (1) Controlo negativo, (2) positivo para *M. gordonae*, (3) positivo para *M. avium*, (4) positivo para o complexo MTC

4. Caracterização da população

A idade média dos pacientes com culturas positivas para MNT foi de 59 anos (20 - 90 anos), 68% (n=73) correspondia a indivíduos do sexo masculino e 34% (n=35) a doentes do sexo feminino.

Relativamente à situação clínica de base não foi possível obter informação de 14 indivíduos, pois eram doentes externos para os quais apenas se procedeu à identificação da micobactéria em causa. Dos restantes indivíduos obteve-se informação de 71 doentes (Figura 3.6). Vinte e nove doentes (40,8%) apresentavam patologia respiratória prévia, maioritariamente doença pulmonar obstrutiva crónica, pneumonia e bronquiectasias; catorze doentes (19,7%) eram HIV positivos e treze doentes apresentavam neoplasia (18,3%).

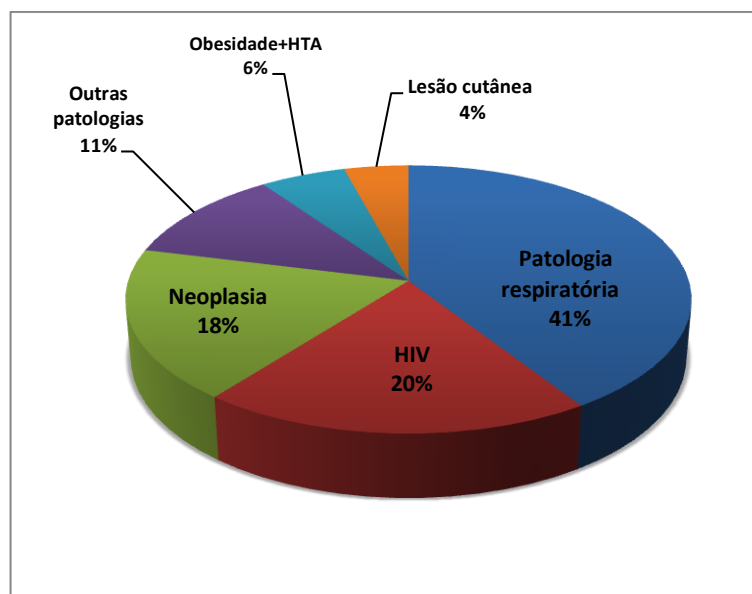


Figura 3.6 – Distribuição percentual das patologias associadas dos doentes estudados (n=71)

5. Doentes infectados por micobactérias não tuberculosas

Dos 71 indivíduos com culturas positivas para MNT e para os quais se obteve os dados acerca da história clínica, apenas em 18 casos (25%) a micobactéria identificada foi considerada causadora de doença. Em 72% (n=13) dos doentes o agente responsável pela doença foi o MAC, o *M. marinum* em 3 doentes, o *M. malmoense* num doente e o *M. xenopi* também num doente (Tabela 3.3).

Foi verificada doença pulmonar crónica em 28% (n=5) dos casos, maioritariamente bronquiectasias. Seis doentes (33%) eram HIV positivos, dos quais um apresentava doença sistémica disseminada, com hemoculturas positivas para MAC. Três doentes apresentavam lesões cutâneas, tendo sido identificada uma estirpe *M. marinum* nos três casos. Três doentes apresentavam um quadro clínico compatível com tuberculose e um doente sofreu em derrame pericárdico em cujo líquido foi identificada uma estirpe MAC (Tabela 3.3 e Tabela 3.4).

Cerca de 66% (n=12) das estirpes foram isoladas de secreções brônquicas, na sua maioria expectoração. Um isolado foi proveniente de líquido pleural e um de líquido pericárdico, sendo os restantes 3 provenientes de biópsia cutânea. Apenas uma estirpe foi isolada em hemocultura (Tabela 3.3 e Tabela 3.4).

Tabela 3.3 - Casos de doença causada por MNT

Casos de doença (n=18)	Patologia associada	Amostra biológica com MNT isolada	Estirpe isolada	Antibioterapia administrada	
1	HIV	AB	MAC	<ul style="list-style-type: none"> • Claritromicina • Rifampicina • Etambutol 	
2	HIV + Hepatite C	EXP	MAC	<ul style="list-style-type: none"> • Claritromicina • Rifampicina • Etambutol 	<ul style="list-style-type: none"> • Isoniazida • Pirazinamida
3	HIV	Sangue	MAC	<ul style="list-style-type: none"> • Claritromicina • Rifampicina • Etambutol 	
4	HIV	AB	MAC	<ul style="list-style-type: none"> • Claritromicina • Rifabutina • Etambutol 	
5	HIV	EXP	MAC	<ul style="list-style-type: none"> • Etambutol • Capreomicina • Amicacina 	<ul style="list-style-type: none"> • Levofloxacina
6	HIV	AB	MAC	<ul style="list-style-type: none"> • Azitromicina 	<ul style="list-style-type: none"> • Cotrimoxazol
7	Antecedentes de TP + Silicose	EXP	MAC	<ul style="list-style-type: none"> • Estreptomicina • Rifampicina 	<ul style="list-style-type: none"> • Isoniazida • Pirazinamida
8	Bronquiectasias	EXP	MAC	<ul style="list-style-type: none"> • Claritromicina • Azitromicina • Etambutol 	<ul style="list-style-type: none"> • Ciprofloxacina
9	Bronquiectasias + Derrame pleural	Líquido pleural	<i>M. xenopi</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Estreptomicina • Rifampicina 	<ul style="list-style-type: none"> • Levofloxacina • Isoniazida • Pirazinamida
10	Bronquiectasias	EXP	MAC	<ul style="list-style-type: none"> • Rifampicina 	<ul style="list-style-type: none"> • Isoniazida • Pirazinamida
11	Bronquiectasias	AB	MAC	<ul style="list-style-type: none"> • Claritromicina • Rifampicina 	<ul style="list-style-type: none"> • Isoniazida
12	Derrame pericárdico	Líquido pericárdico	MAC	<ul style="list-style-type: none"> • Claritromicina • Rifabutina • Etambutol 	

HIV (Human Immunodeficiency Virus); AB (Aspirado brônquico); MAC (*Mycobacterium avium complex*); EXP (Expectoração); TP (Tuberculose Pulmonar)

Tabela 3.4 – Quadro clínico de doentes apenas com doença causada por MNT

Casos de doença (n=18)	Quadro clínico	Amostra biológica com MNT isolada	Estirpe isolada	Antibioterapia administrada	
13	Lesão cutânea	Biópsia cutânea	<i>M. marinum</i>	• Claritromicina	• Ciprofloxacina
14	Lesão cutânea	Biópsia cutânea	<i>M. marinum</i>	• Claritromicina	• Doxiciclina
15	Lesão cutânea	Biópsia cutânea	<i>M. marinum</i>	• Claritromicina	• Ciprofloxacina
16	Compatível com TP	EXP	<i>M. malmoense</i>	• Claritromicina • Rifampicina • Etambutol	• Isoniazida
17	Compatível com TP	AB	MAC	Seguimento no exterior	
18	Compatível com TP	EXP	MAC	Seguimento no exterior	

TP (Tuberculose Pulmonar); EXP (Expectoração); AB (Aspirado Brônquico); MAC (*Mycobacterium avium complex*)

Todos os doentes foram sujeitos a uma terapia combinada de vários antibióticos antibacilares, indicados para o tratamento de doença provocada por MNT, incluindo claritromicina, azitromicina, rifabutina, amicacina e etambutol (Tabela 3.3 e 3.4).

Em relação a dois doentes não foi possível obter informação sobre o plano terapêutico, uma vez que após o diagnóstico foram acompanhados clinicamente noutra instituição de saúde.

Para nenhum doente foi possível obter informação acerca do tempo de duração do tratamento nem a sua evolução.

IV DISCUSSÃO

As micobactérias não tuberculosas encontram-se dispersas na natureza e ao contrário das espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* nem sempre são patogénicas e apresentam patogenicidade variável. A capacidade das MNT em produzir doença está claramente documentada na literatura e a sua importância aumentou progressivamente, com isolamentos cada vez mais frequentes, das várias espécies (36, 39). A identificação de MNT baseada em provas bioquímicas, características fenotípicas e velocidade de crescimento é um procedimento demorado e por vezes difícil de interpretar, dificultando a imediata e precisa aplicação de terapêutica. O desenvolvimento de técnicas de caracterização molecular de microrganismos abriu novas possibilidades no campo da classificação, identificação e diagnóstico.

Neste estudo o objectivo foi avaliar em que medida o isolamento de micobactérias não tuberculosas é importante para o estabelecimento do diagnóstico de doença e para a determinação da estratégia terapêutica.

Neste estudo, de um total de 433 estirpes de micobactérias identificadas no período de 2006 a 2010, 108 (25%) eram micobactérias não tuberculosas. Ao longo do tempo houve um aumento da percentagem de MNT isoladas (15% em 2006, 17% em 2007, 30% em 2008, 29% em 2009 e 37% em 2010). Entre os muitos factores que podem ter contribuído para esse aumento estão a pandemia HIV e a ocorrência de outras doenças, a melhoria das técnicas de isolamento e identificação de MNT, o aumento do interesse na identificação de MNT e a melhoria dos serviços de saúde pública para a tuberculose (59).

Das amostras positivas, apenas 5% dos casos apresentaram exame directo positivo após homogeneização. Isto deve-se ao facto do exame directo ser uma técnica com baixa sensibilidade, exigindo a presença de, pelo menos, 10^4 bacilos/ml para se obter um exame positivo. Assim, o exame cultural continua a ser fundamental pois permite o diagnóstico de uma micobacteriose através da identificação da estirpe isolada. Basta a presença de 10 bacilos/ml de amostra para se obter um exame cultural positivo sendo

assim, uma técnica mais sensível que o exame directo. Em geral, a sensibilidade do exame cultural é de 80-85% e a especificidade de aproximadamente 98% (51). A partir de uma cultura positiva é possível proceder a testes para avaliar a sensibilidade aos fármacos antibacilares e demonstrar a eficácia do tratamento, e determinar o tempo até a negatificação das culturas.

A maioria das micobactérias não tuberculosas (81%) foi isolada de amostras do tracto respiratório, nomeadamente expectoração e aspirado brônquico. As restantes, foram isoladas de diferentes amostras, incluindo sangue, líquido pleural, líquido pericárdico, urina, suco gástrico e biópsias (pulmonar, ganglionar e cutânea).

Das 108 estirpes isoladas, 71 cresceram em meio líquido MGIT e 61 em meio sólido Lowenstein-Jensen, verificando-se que apenas 25 (23%) cresceram simultaneamente nos dois meios utilizados. As estirpes MAC apresentaram um crescimento mais eficaz em meio líquido (n=41) do que em meio sólido (n=15), o que está de acordo com os resultados obtidos em estudos anteriores (60, 61). As restantes estirpes (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. marinum* e *M. goodii*) cresceram melhor no meio sólido que no meio líquido. As estirpes *M. xenopi*, *M. mageritensis* e *M. scrofulaceum* só cresceram no meio líquido. A maior eficácia do meio líquido MGIT poderá ser explicada pelo maior volume de amostra que nele é inoculado e pelos suplementos nutritivos incorporados no meio (62).

Relativamente ao tempo de crescimento não houve diferenças significativas em relação ao descrito na literatura (1, 2, 37). A maioria das MNT cresceu em média entre 2 a 3 semanas. As espécies de crescimento rápido cresceram até sete dias após inoculação no meio líquido, demorando mais tempo no meio sólido (até 2 semanas). Com excepção do *M. goodii* e do *M. marinum*, as MNT cresceram mais rapidamente no meio líquido. A maior diferença foi observada para as estirpes MAC, que cresceram, em média, em 13 dias no meio líquido, contrastando com 5 semanas, em média, no meio sólido.

Após observação da morfologia microscópica e macroscópica das colónias, e determinação do tempo de crescimento das micobactérias nos meios de cultura, procedeu-se à sua identificação utilizando um dos métodos moleculares. Das 89 estirpes

testadas pelo método Inno-lipa foi possível identificar qual a espécie presente em cerca de 85% (n=76) das amostras com micobactérias. Nas restantes 13 amostras apenas foi possível concluir que pertencem ao género *Mycobacterium*, pertencendo a uma espécie que não é identificada pelo teste Inno-lipa. Este demonstrou ser um método molecular capaz de identificar muitas espécies, com alta sensibilidade e especificidade tal como mostrado por Tortoli et al (2003) (63). Pelo método Accuprobe foram identificadas 19 estirpes. A principal vantagem da técnica é a simplicidade e a rapidez com que é possível fazer a identificação da estirpe. Os resultados revelaram que esta técnica é específica e sensível tal como mostrado anteriormente por Lebrun et al (1992) (64). A desvantagem deste método reside no facto de actualmente só se poderem identificar quatro espécies/complexos, complexo *M. tuberculosis* e *M. avium*, *M. kansasii* e *M. goodii*. Embora estas micobactérias correspondam às mais frequentemente isoladas, com este método não se conseguiria identificar 47% das MNT isoladas no presente estudo.

As micobactérias não tuberculosas mais frequentemente isoladas foram as do complexo MAC seguidas pelo *M. fortuitum* e *M. chelonae*. As MNT isoladas foram consideradas causadoras de doença em 25% dos casos. A espécie mais prevalente nos casos de doença foi o MAC, provocando doença pulmonar em 11 casos, infecção disseminada num caso e derrame pericárdico num outro caso.

As infecções pulmonares causadas por MNT têm sido reconhecidas como causa do aumento de morbilidade e mortalidade (65). As manifestações clínicas e radiográficas das infecções por MNT são variáveis e dificultam o estabelecimento do diagnóstico correcto. Os sinais e sintomas da doença pulmonar causada pelas MNT são variáveis e inespecíficos. Os pacientes podem apresentar tosse crónica com expectoração e menos frequentemente fadiga, febre, hemoptise e perda de peso (65). A doença pulmonar causada por MAC, *M. kansasii* e *M. malmoense* pode manifestar-se como infecção clássica cavitária semelhante a tuberculose pós-primária (66). Nas estirpes identificadas apenas uma era *M. malmoense*. Foi isolada a partir de uma amostra de expectoração e o doente apresentava um quadro clínico compatível com tuberculose pulmonar.

Apenas num caso, uma estirpe MAC causou infecção disseminada. Os pacientes com doença disseminada quase sempre apresentam alguma alteração do sistema

imunológico. Os principais factores de risco incluem infecção por HIV, doenças hematológicas, transplante de órgãos (terapêutica imunossupressora) e tratamento com corticóides. A infecção disseminada é muito mais frequente em pacientes com SIDA que em pacientes HIV negativos (67, 68, 69).

Um dos doentes com uma estirpe MAC apresentou derrame pericárdico e apesar de não ser comum, há alguns casos descritos, principalmente em doentes HIV positivos (70). Na Europa, a pericardite tuberculosa ocorre em 5% dos pacientes com tuberculose (71) e é uma condição potencialmente letal. O derrame pericárdico é principalmente devido a hipersensibilidade à proteína das micobactérias (72). A propagação de organismos para o pericárdio geralmente ocorre a partir do mediastino, nódulos linfáticos ou pulmões. Normalmente, o processo começa como pericardite constrictiva com derrame e em fases posteriores podem ser detectados granulomas caseosos envolvendo o pericárdio (73).

Apenas uma estirpe de *M. xenopi* foi considerada causadora de doença. O doente apresentava patologia respiratória prévia, nomeadamente bronquiectasias, e sofreu um derrame pleural, do qual a micobactéria foi isolada. Na infecção pulmonar por *M. xenopi* é frequente a existência de cavitações pulmonares. As cavidades têm paredes finas, geralmente com pouca infiltração, mas não é comum ocorrer derrame pleural (74).

Infecções da pele e tecidos moles (mão, cotovelo, joelho e pé) causadas por MNT são caracterizadas por lesões granulomatosas que se desenvolvem algumas semanas após a infecção, podendo evoluir para ulceração, celulite e até mesmo disseminação cutânea. As fontes mais comuns de infecção incluem o contacto com água contaminada ou peixes infectados, traumas e feridas cirúrgicas. A infecção cutânea causada por *M. marinum*, afecta principalmente pessoas que possuem aquários ou contactam com peixe. A lesão, geralmente na mão ou no antebraço, é inicialmente nodular mas pode posteriormente ulcerar e a cura espontânea da lesão é muito rara (75). A suspeita clínica é por conseguinte um pré-requisito importante para um diagnóstico microbiológico bem sucedido. Neste estudo foram isoladas 3 estirpes de *M. marinum*, em biópsias de doentes que apresentavam lesões cutâneas e estavam envolvidos em manutenção de aquários.

O tratamento da doença por MNT raramente é simples. A duração da terapia é frequentemente prolongada e os regimes de tratamento muitas vezes são mal tolerados por causa dos efeitos secundários mais frequentes. A decisão de tratar deve ser equilibrada entre o risco de progressão da doença e exposição à toxicidade dos medicamentos.

Na doença pulmonar ou disseminada causada por MAC, a claritromicina é a droga de escolha, no entanto, deve ser associada a pelo menos duas outras drogas para garantir a eficácia do tratamento, caso se trate de uma estirpe resistente a este antibiótico. Estudos comparativos entre a eficácia da azitromicina e claritromicina associadas ao etambutol demonstraram que a obtenção de culturas negativas de expectoração ocorreu mais rapidamente no grupo que utilizou a claritromicina (49). Neste estudo, 56% dos doentes com doença pulmonar provocada por MAC, foram tratados com claritromicina associada a pelo menos mais dois antibióticos, principalmente rifampicina, etambutol e isoniazida, o mesmo se verificando para o doente infectado com *M. malmoense*; um doente foi tratado com azitromicina e cotrimoxazol; apenas o tratamento de dois doentes não incluía claritromicina.

No caso de doença disseminada por MAC, o doente foi tratado com a associação de claritromicina, rifampicina e etambutol. Apesar da ausência de estudos clínicos, especialistas recomendam que para a infecção disseminada ou quando ocorram cavitações pulmonares, a amicacina e uma quinolona (ciprofloxacina ou levofloxacina) sejam acrescentadas ao esquema de claritromicina, rifampicina e etambutol (49).

O doente infectado com *M. xenopi* foi tratado com estreptomicina, rifampicina, isoniazida, pirazinamida e levofloxacina. Os aminoglicosídeos (por exemplo amicacina e estreptomicina) são utilizados principalmente em casos de resistência à claritromicina (76). O tempo de uso é controverso, sendo sugerido o tratamento pelo menos até as culturas serem negativas.

Nas doenças cutâneas causadas por *M. marinum* o tratamento é variável, podendo incluir excisão cirúrgica e o tratamento com drogas utilizadas para a tuberculose (75). A combinação de rifampicina e etambutol ou a monoterapia com doxiciclina, minociclina e cotrimoxazol pode ser utilizado. Há casos bem sucedidos de tratamento apenas com o

uso de claritromicina (50). Neste estudo, os doentes com lesões cutâneas causadas por *M. marinum* foram tratados com claritromicina associada a ciprofloxacina ou doxiciclina.

O diagnóstico de doença por MNT exige alguma precaução pois o seu isolamento a partir de amostras biológicas de locais não estéreis do organismo pode significar colonização transitória ou contaminação. Assim, uma avaliação conjunta das características clínicas e bacteriológicas é de fundamental importância para o estabelecimento do diagnóstico de doença por MNT e para determinação da estratégia terapêutica (77).

V CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a identificação de micobactérias não tuberculosas por métodos moleculares é essencial pois permite uma identificação específica e sensível de um vasto número de diferentes espécies num curto período de tempo.

Neste estudo verificou-se que as estirpes do complexo MAC são as que apresentam maior prevalência entre as micobactérias não tuberculosas. Nos casos de doença provocada por MNT este é também o mais prevalente, sendo responsável principalmente, por infecções pulmonares em doentes com patologia pulmonar prévia e em doentes HIV positivos. Para todos os casos de doença foi instituída terapêutica de acordo com a micobactéria não tuberculosa identificada na amostra, a situação clínica do doente e as patologias associadas.

Pode-se assim concluir que o isolamento de micobactérias não tuberculosas é importante para o estabelecimento do diagnóstico de doença e consequente estratégia terapêutica, de forma mais rápida e adequada.

VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pfyffer GE *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection and staining procedures. In: Murray PR, Barron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, (eds). Manual of clinical Microbiology. 9th ed. Washington DC: American Society for Microbiology. 2007; p 543–572
2. Sousa JPC, Rodrigues AM, Exposto F. *Mycobacterium*. In: Ferreira WF, Sousa JC. Microbiologia. Lisboa: Lidel. 2000; Vol 2 p 85-98
3. Hong X, Hopfinger AJ. Construction, molecular modeling, and simulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell walls. *Biomacromolecules*. 2004; 5(3):1052-1065
4. Crick DC, Mahapatra S, Brennan PJ. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology*. 2001; 11(9):107R-18R
5. Schroeder EK. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Pharm Biotechnol*. 2002; 3: 197-225
6. Wayne LG, Kubica GP. Family *Mycobacteriaceae*: Genus *Mycobacterium*. In: Sneath PH, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, (eds). Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins. 1986; vol II, p 1436-1457
7. Wollinsky E. Mycobacteria. In Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS (eds.). Microbiology. Philadelphia: J. B. Lippincott Company. 1990; p647-664
8. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech*. 2001; 20(1):21-54
9. Timpe A, Runyon EH. The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease: a preliminary report. *J Lab Clin Med*. 1954; 44(2): 202-209
10. Tortoli E. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006; 48(2): 159-78
11. David H, Brander E, Casal-Roman M et al, Micobacteriologia clínica e de saúde pública – Manual da Sociedade Europeia de Micobacteriologistas. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Lisboa, 1986
12. Van Soolingen D, Haas PE, et al. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1993; 31(8): 1987-1995
13. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99: 3684–3689

14. Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption - a review on tuberculosis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006; 101(7):697-714
15. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998; (6685):537-44
16. Bloom BR, Murray CJ. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*. 1992; 257(5073):1055-64
17. Koch R. Die Aetiologie der Tuberculose. *Am Rev Tuberc*. 1932; 25: 285-323 [Translate from the 1882 original article by Berna Pinner and Max Pinner]
18. Pina J. A Tuberculose na viragem do milénio. Lisboa: Lidel. 2000
19. World Health Organization (WHO): Global Tuberculosis Control 2011 (WHO/HTM/TB/2011.1)
20. DGS 2011 - Stop TB 2011. Programa Nacional de Luta contra a Tuberculose, Ponto da situação epidemiológica e de desempenho; Relatório para o Dia Mundial da Tuberculose. Março, 2011
21. David H, Brum L, Prieto E. Manual de Micobacteriologia em Saúde Pública. Princípios e Métodos. Inst. Hig. Med. Trop. Lisboa. 1994
22. Kristiki A and Melo FAF, Chapter 15: Tuberculosis in Adults. In: Palomino JC, Leão SC and Ritacco V (eds). Tuberculosis 2007, From Basic Science to Patient Care. 1th edi. 2007. p 487-524. www.tuberculosisistextbook.com
23. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16(3):463-96
24. Van Rie A, Warren R, Richardson M, et al. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med*. 1999; 341: 1174-1179
25. Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1989; 320: 545-550
26. World Health Organization. Treatment of tuberculosis. Guidelines for national programmes. (WHO/CDS/TB2003.313)
27. Shamputa IC, Van Deun A, Salim MA, Hossain MA, Fissette K, de Rijk P, et al. Endogenous reactivation and true treatment failure as cause of recurrent tuberculosis in a high incidence setting with a low HIV infection *Trop Med Int Health*. 2007; 12(6):700-8
28. Umubyeyi AN, Shamputa IC, Rigouts L, Dediste A, Karita E, Struelens MJ, et al. Molecular investigation of recurrent tuberculosis in patients from Rwanda. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007; 11(8):860-7

29. Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis.* 1979; 119: 107 -59
30. Aksamit TR. Mycobacterium avium complex pulmonary disease in patients with pre - existing lung disease. *Clin Chest Med.* 2002; 23:643 -53
31. Daley LC, Griffith ED. Pulmonary disease caused by rapid growing mycobacteria. *Clin Chest Med.* 2002; 23: 623 -32
32. Barreto JA, Palaci M, Ferrazoli L, Martins MC, Suleiman J, Lorencó R, et al. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from bone marrow aspirates of AIDS patients in Brazil. *J Infect Dis.* 1993; 168(3):777-9
33. Freitas M, Axelsson LG, Cayuela C, Midtvedt T, Trugnan G. Indigenous microbes and their soluble factors differentially modulate intestinal glycosylation steps in vivo. Use of a "lectin assay" to survey in vivo glycosylation changes. *Histochem Cell Biol.* 2005; 124(5):423-33
34. Winthrop KL, Abrams M, Yakrus M, Schwartz I, Ely J, Gillies D, et al. An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon. *N Engl J Med.* 2002; 346(18):1366-71
35. Marras TK, Daley CL. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med.* 2002; 23(3):553-67
36. Falkingham JO. The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. *Can J Infect Dis.* 2003; 14(5):281-6
37. Schlossberg D. Tuberculosis & Nontuberculous Mycobacterial Infections. 5th ed. Philadelphia: McGraw-Hill. 2006; p 413-494
38. McGarvey JM, Bermudez LE. Pathogenesis of nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med.* 2002; 23:2002
39. American Thoracic Society. Diagnosis and Treatment of Disease Caused by Nontuberculous Mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997
40. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(2):319-54
41. Wolinsky E. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 1992
42. Zumla A, Grange J. Infection and disease caused by environmental mycobacteria. *Curr Opin Pulm Med.* 2002;8:166-72
43. Clark RB, Spector H, Friedman DM, Oldrati KJ, Young CL, Nelson SC. Osteomyelitis and synovitis produced by *Mycobacterium marinum* in a fisherman. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(11):2570-2

44. Henriques B, Hoffner SE, Petrini B, et al. Infection with *Mycobacterium malmoeense* in Sweden: Report of 211 cases. *Clin Infect Dis*. 1994; 18: 596-600
45. Smith MB, Schnadig VJ, Boyars MC, Woods GL. Clinical and pathologic features of *Mycobacterium fortuitum* infections. An emerging pathogen in patients with AIDS. *Am J Clin Pathol*. 2001; 116(2):225-32
46. Wolinsky E. Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. *Clin Infect Dis*. 1995; 20(4):954-63
47. Post FA, Willcox PA, Mathema B, Steyn LM, Shean K, Ramaswamy SV, et al. Genetic polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with chronic multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis*. 2004; 190(1):99-106
48. Sousa JC. Manual de antibióticos antibacterianos. 2ª ed. Porto: Universidade Fernando pessoa. 2006; p 639-670
49. Karakousis PC, Moore RD, Chaisson RE. *Mycobacterium avium* complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4(9):557-65
50. Wagner D, Young LS. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. *Infection*. 2004; 32(5):257-70
51. American Thoracic Society. Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; p 5221-5243
52. Casal M, Gutierrez J, Vaquero M. Comparative evaluation of the mycobacteria growth indicator tube with the BACTEC 460 TB system and Lowenstein-Jensen medium for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1997; 1(1): 81-4
53. Badak FZ, Goksel S, Sertoz R, Nafie B, Ermertcan S, Cavusoglu C, et al. Use of nucleic acid probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from MB/BacT bottles. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(5):1602-5
54. Drosten C, Panning M, Kramme S, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by Real-Time PCR Using Pan-Mycobacterial Primers and a Pair of Fluorescence Resonance Energy Transfer Probes Specific for the M. tuberculosis Complex. *Clin Chem*. 2003
55. Yam WC, Yuen KY, Kam SY, Yiu LS, Chan KS, Leung CC, et al. Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. *J Med Microbiol*. 2006; 55(Pt 5):529-36
56. Drobniewski FA, Wilson SM. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*-a molecular story. *J Med Microbiol*. 1998; 47(3):189-96

57. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis.* 1998;79(1):3-29
58. Koneman et al. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Company. 1997; p 893-938
59. Martin-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J, Thomsen VO, Curcio M, Fauville-Dufaux M, et al. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; 8(10):1186-93
60. Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro AP, Passerinitosi C, Nista D, Bornigia S et al. Comparison of MB/BacT ALERT 3D system with Radiometric BACTEC system and Lowenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a Multicenter Study. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(2):651–657
61. Lu D, Heeren B, Dunne WM. Comparison of the Automated Mycobacteria Growth Indicator Tube System (BACTEC 960/MGIT) with Lowenstein-Jensen Medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Am J Clin Pathol.* 2002;118(4):542-545.
62. Idigoras P, Beristain X, Iturzaeta A, Vicente D, Pérez-Trallero E. Comparison of the Automated Nonradiometric BactecMGIT 960 system with Lowenstein-Jensen, Coletsos, and Middlebrook 7H11 solid media for recovery of micobactéria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19:350–354
63. Tortoli E, Nanetti A, Piersimoni C, Cichero P, Farina C, Mucignat G, et al. Performance assessment of new multiplex probe assay for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(3):1079-84
64. Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, Vincent-Levy-Frebault V. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(9):2476-8
65. Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS. Nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases in immunocompetent patients. *Korean J Radiol.* 2002; 3(3):145-57
66. Martinez S, McAdams HP, Batchu CS. The many faces of pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. *AJR Am J Roentgenol.* 2007; 189(1):177-86
67. Vejlgaard TB, Haahr V, Peterslund NA. [Atypical mycobacteria. Disseminated infection in patients with hematologic diseases]. *Ugeskr Laeger.* [abstract] 1997; 159(36):5362-7
68. Skogberg K, Ruutu P, Tukiainen P, Valtonen VV. Nontuberculous mycobacterial infection in HIV-negative patients receiving immunosuppressive therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995; 14(9):755-63

69. Holland SM, Eisenstein EM, Kuhns DB, Turner ML, Fleisher TA, Strober W, et al. Treatment of refractory disseminated nontuberculous mycobacterial infection with interferon gamma. A preliminary report. *N Engl J Med*. 1994; 330(19):1348-55
70. Woods G, Goldsmith J. Fatal pericarditis due to *Mycobacterium avium* intracellulare in acquired immunodeficiency syndrome. *Chest*. 1989; 95:1355-6
71. Lange RA, Hillis LD. Acute Pericarditis. *N Engl J Med*. 2004; 351:2195–2202
72. Lorell BH, Braunwald E. Heart disease. 4th ed. Philadelphia: Saunders WB; 1992. p 1456-507
73. Mayosi BM, Burgess LJ, Doubell AF. Tuberculous pericarditis: Heart disease in Africa. *Circulation*. 2005;112:3608-16
74. El-Solh AA, Nopper J, Abdul-Khoudoud MR, Sherif SM, Aquilina AT, Grant BJ. Clinical and radiographic manifestations of uncommon pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in AIDS patients. *Chest*. 1998; 114(1):138-45
75. Blackwell V. *Mycobacterium marinum* infections. *Curr Opin Infect Dis*. 1999; 12(3):181-4
76. Dube MP, Torriani FJ, See D, Havlir DV, Kemper CA, Leedom JM, et al. Successful short-term suppression of clarithromycin-resistant *Mycobacterium avium* complex bacteremia in AIDS. California Collaborative Treatment Group. *Clin Infect Dis*. 1999; 28(1):136-8
77. American Thoracic Society: CDC; Council of the Infectious Disease Society of America. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1376-95

VII. ANEXOS

ANEXO A: TÉCNICA DE HOMOGENEIZAÇÃO, SEMENTEIRAS E COLORAÇÃO

Procedimentos

Técnica de homogeneização

- 1- Marcou-se um tubo de 50 ml, esterilizado e com tampa de rosca, com o número da amostra
- 2- Adicionou-se 5-10 ml de amostra
- 3- Adicionou-se igual quantidade de solução *MycoPrep*TM
- 4- Rolhou-se o tubo, agitou-se vigorosamente no vórtex (20-30 segundos) e deixou-se a solução actuar, em repouso, durante 15 minutos
- 5- Adicionou-se tampão fosfato *MycoPrep*TM até perfazer 50 ml. Rolhou-se novamente o tubo e inverteu-se
- 6- Centrifugou-se a 3000 g durante 15 minutos
- 7- Decantou-se o sobrenadante e flamejou-se a boca do tubo
- 8- Executou-se o esfregaço em lâmina (1 gota do sedimento bem do fundo do tubo) para posterior coloração pela técnica de Tan-Thiam-Hok
- 9- Ressuspendeu-se o sedimento em $\pm 1,5$ ml de tampão fosfato (tem como objectivo um último acerto de pH e obter um volume mínimo para as culturas e salvaguarda da amostra processada)

Sementeiras

- Meio sólido: colocou-se 3-4 gotas de sedimento ressuspendido no meio de lowenstein-jensen, espalhando bem pelo “slant” (este meio incubou até um máximo de 6 semanas a 37º na estufa de atmosfera normal)
- Meio líquido: distribuiu-se 0,8 ml de PANTA (polimixina B, anfotericina, ácido nalidixico, trimetropin e azlocilina) em todos os tubos MGIT e adicionou-se 0,5 ml de sedimento ressuspendido. Introduziu-se no sistema MGIT 960

Salvaguarda

O sedimento restante foi congelado a -20°C para posterior utilização se necessário.

Coloração de Tan-Thiam-Hok

- 1- Cobriu-se a lâmina com solução de Kinyoun durante 5 minutos
- 2- Lavou-se com água corrente (\pm 1 minuto)
- 3- Cobriu-se a lâmina com solução de Gabett durante 2 minutos
- 4- Lavou-se com água corrente
- 5- Após a lâmina estar secar observou-se ao microscópio

ANEXO B: TESTE INNO-LIPA MYCOBACTERIA v2**Procedimentos*****Extracção (meio sólido)***

- 1- Pipetou-se 1,5 ml de tampão TE pH 8.0 (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA) para um tubo de microcentrífuga e suspendeu-se algumas colónias de micobactérias
- 2- Colocou-se a amostra no bloco de aquecimento a 100°C durante 10 minutos
- 3- Centrifugou-se amostra a 13000 rpm durante 5 minutos na microcentrífuga
- 4- Posteriormente usou-se 2 µl do sobrenadante para amplificação

Extracção (meio líquido)

- 1- Pipetou-se 0,2 ml da cultura em meio líquido para um tubo de microcentrífuga, centrifugou-se a 13000 rpm durante 15 minutos e descartou-se o sobrenadante
- 2- Centrifugou-se novamente a 13000 rpm durante 10 segundos e descartou-se o restante sobrenadante
- 3- Suspendeu-se o sedimento em 20 µl de tampão TE pH 8.0 e colocou-se no bloco de aquecimento a 95°C durante 30 minutos
- 4- Após a incubação centrifugou-se a amostra a 13000 rpm durante 10 segundos e congelou-se a -20°C durante 30 minutos
- 5- Descongelou-se a amostra, agitou-se no vórtex e centrifugou-se a 13000 rpm durante 10 segundos
- 6- Posteriormente usou-se 10 µl do sobrenadante para amplificação

Amplificação da amostra

- 1- Preparou-se a mistura de amplificação, adicionando 27,7 µl de água destilada estéril, 10 µl de tampão de amplificação (desoxirribonucleotídeos trifosfatados-dNTPs), 10 µl de solução *MYC primer* (*primers* biotinilados e MgCl₂) e 0,3 µl de Taq polymerase (Roche) (para cada amostra), num tubo estéril colocado em gelo

- 2- Agitou-se a mistura no vórtex e transferiu-se 48 µl para os tubos de PCR, colocados em gelo
- 3- Pipetou-se 2 µl de amostra obtida na extracção (sobrenadante)
- 4- Adicionou-se 2 µl de tampão TE pH 8.0 ao tubo de controlo negativo
- 5- Introduziu-se os tubos no termociclador e iniciou-se a PCR

Protocolo de amplificação

Passo	Temperatura	Tempo	
1. Desnaturação	95°C	1 minuto	
2. Desnaturação	95°C	30 segundos	Repetir 40 vezes
3. Annealing	62°C	30 segundos	
4. Extensão	72°C	30 segundos	
5. Arrefecimento	4°C		

Hibridização, Lavagem adstringente e Desenvolvimento de cor

- 1- Marcaram-se duas tiras (refª 57218), uma como controlo negativo e uma com o número da amostra e usando pinças colocaram-se no tabuleiro de incubação
- 2- Pipetou-se 10 µl de solução de desnaturação (solução alcalina com EDTA) e adicionou-se 10 µl do controlo negativo ou do produto da amplificação
- 3- Deixou-se incubar á temperatura ambiente durante 5 minutos

As etapas de hibridização, lavagem adstringente e desenvolvimento de cor foram executadas na sua totalidade no sistema automático Auto-lipa. Este é um sistema completamente independente que proporciona aquecimento, arrefecimento, aspiração e pipetagem automatizados.

Após a desnaturação colocou-se o tabuleiro de incubação no equipamento Auto-lipa e o restante processo foi efectuado automaticamente.

- 1- Foram adicionados 2 ml de solução de hibridização morna (tampão SSC com detergente e conservantes a 62°C) às tiras de teste e incubadas durante 30 minutos a 62°C, numa plataforma de agitação
- 2- Após o tempo de incubação as tiras foram lavadas duas vezes durante 3 minutos com 2 ml de solução de lavagem adstringente (tampão SSC com detergente e conservantes), seguida de uma nova incubação a 62°C durante 4 minutos
- 3- O restante procedimento foi realizado à temperatura ambiente. As tiras foram lavadas duas vezes com solução de enxaguamento (tampão fosfato com NaCl e Triton®), e foram adicionados 2 ml de conjugado (estreptavidina marcada com fosfatase alcalina e tampão tris) e incubou-se durante 30 minutos. Após a incubação, as tiras foram lavadas duas vezes com 2 ml de solução de enxaguamento e uma vez com 2 ml de tampão de substrato (tampão tris com NaCl e MgCl₂) antes da incubação com 2 ml de solução de substrato (contendo o cromogénio) durante 30 minutos com agitação. Por fim, as tiras foram lavadas duas vezes com 2 ml de água destilada, com agitação durante 3 minutos.

No fim do procedimento, usando pinças retiraram-se as tiras, do tabuleiro de incubação. As tiras foram então colocadas em papel absorvente e após estarem completamente secas interpretou-se os resultados. A presença de uma linha nitidamente visível traduz uma reacção positiva.

ANEXO C: TESTE ACCUPROBE

Procedimentos

Preparação e lise da amostra

- 1- Pipetou-se 100 µl de reagente de lise (solução tampão contendo 0,04% de azida sódica) e 100 µl do tampão de hibridização para o tubo de lise (contém esferas de vidro e tampão). Se a cultura for em meio líquido não se adiciona reagente de lise
- 2- Transferiu-se 100 µl da cultura em meio líquido (ou 1 colónia de meio sólido) para o tubo de lise, fechou-se e agitou-se no vórtex
- 3- Colocou-se o tubo de lise no sonicador durante 15 minutos
- 4- Retirou-se o tubo do sonicador e incubou-se a 95°C durante 10 minutos

Hibridização

- 1- Pipetou-se 100 µl da amostra lisada e colocou-se no tubo reagente sonda
- 2- Tapou-se o tubo e incubou-se a 60°C durante 15 minutos

Seleção

- 1- Retirou-se o tubo reagente sonda do bloco de aquecimento e adicionou-se 300 µl de reagente seleção. Tapou-se e agitou-se no vórtex
- 2- Incubou-se a 60°C durante 5 minutos
- 3- Retirou-se o tubo do bloco de aquecimento e deixou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos.

Detecção

- 1- No luminómetro, colocou-se o reagente de detecção I (0,1% de peróxido de hidrogénio em ácido nítrico 0,001N) e o reagente de detecção II (hidróxido de sódio 1N) nas respectivas posições
- 2- Seleccionou-se o protocolo apropriado
- 3- Retiraram-se os resíduos da superfície dos tubos com papel absorvente humedecido
- 4- Procedeu-se à leitura (no prazo de 1 hora)